

**Doppelstrang-RNA-vermittelte Gen-Interferenz (RNAi) im
Nervensystem adulter Grillen (*Gryllus bimaculatus*):
Auswirkungen der Herunterregulierung des *nonA*-Gens
auf den Lockgesang**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl.-Biol. Sven Knapinski
(1. Juli 1975, Essen)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Bernhard Ronacher
2. Prof. Dr. Harald Saumweber
3. PD Dr. Frieder Mayer

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2010

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, zum Verständnis der genetischen Grundlagen des akustischen Kommunikationssystems der Grille *Gryllus bimaculatus* beizutragen (s. auch 1.2). Dazu wurde die Expression eines Orthologs des *no-on-transientA*-Gens (*nonA*) mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode spezifisch herunterreguliert. Bei *nonA* handelt es sich um ein vielversprechendes Kandidatengen, da Punktmutationen in der codierenden Region des Gens die Eigenschaften des männlichen Balzgesangs bei *Drosophila melanogaster* beeinflussen. Zudem belegen Gentransfer-Experimente bei *Drosophila*, dass dieses Gen artspezifische Informationen des Balzgesangs enthält.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst das *nonA* homologe Gen aus *Gryllus bimaculatus* kloniert, um im Anschluss eine Methode zu entwickeln, die zu einer effizienten Herunterregulierung des Gens im Nervensystem der Grille führt. Der Erfolg der Inhibition wurde molekularbiologisch auf mRNA-Niveau und durch den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antikörper auch auf Proteinniveau kontrolliert. Im Rahmen der Gesangsuntersuchungen wurde die Silbenperiode in Abhängigkeit von der Temperatur, die max. Silbenzahl pro Chirp sowie die tageszeitliche Gesangsaktivität erfasst. Zudem wurden transgene *Drosophila melanogaster* hergestellt, deren arteigenes *nonA* durch das der Grille ersetzt bzw. ergänzt wurde. Die transgenen Fliegen wurden hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit und ihres phototaktischen Verhaltens untersucht, da über diese Merkmale Rückschlüsse auf die funktionelle Konserviertheit des *nonA*-Gens zwischen den Arten *Drosophila melanogaster* und *Gryllus bimaculatus* gezogen werden können.

Die Evaluierung der Wirkung von RNAi in semiquantitativen Tests ergab, dass Grillen, die als Subadulti behandelt worden waren, eine sehr starke Reduktion der *nonA*-mRNA sowie des NONA-Proteins aufwiesen bzw. die mRNA sowie das Protein i.d.R. nicht mehr nachweisbar waren. Tiere, die als Adulti behandelt worden waren, zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der mRNA sowie des Proteins, allerdings konnten bei diesem Ansatz i.d.R. noch geringe Mengen nachgewiesen werden.

Die Analyse der Gesangsdaten ergab, dass sich die Periodenlänge durch das Herunterregulieren von NONA nicht verändert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere seltener 3-silbige Chirps produzieren, dafür aber mehr 4- und 5-silbige Chirps. Die Auswertung der tageszeitlichen Gesangsaktivität zeigte, dass alle Tiere signifikant am häufigsten im ersten Nachtquartal (nach Erlöschen der Beleuchtung) zirpten. Ein Effekt durch das Herunterregulieren von NONA konnte statistisch nicht belegt werden.

Allerdings schien es einen Trend bei *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren zu geben, gleichmäßiger über den Tag verteilt Gesangsaktivität zu zeigen.

Transgene *Drosophila melanogaster*, deren arteigenes *nonA* durch das der Grille ersetzt bzw. ergänzt worden war, zeigten durchweg eine verbesserte Überlebensfähigkeit (Steigerungen zwischen 27 und 340%). Auch das positiv phototaktische Verhalten wurde durch das Grillen-NONA bei allen transformanten Fliegen verstärkt; allerdings fiel dieser Effekt eher marginal aus. Dennoch kann durchaus von einer zumindest teilweisen funktionellen Konservierung des *nonA*-Gens zwischen *Gryllus bimaculatus* und *Drosophila melanogaster* ausgegangen werden.

Schlagwörter: *Gryllus bimaculatus*, Lockgesang, RNAi, *nonA*

Abstract

The present thesis aims to widen our understanding of the genetic background of the acoustic communication system of the cricket *Gryllus bimaculatus* (see also 1.2). Therefore the expression of an ortholog of the *no-on-transientA* (*nonA*) gene was specifically inhibited via RNA-interference. The *nonA* gene is one of the most interesting candidate genes in this context, as point mutations in the coding region of the gene affect the characteristics of the male's calling song. Furthermore, gene transfer experiments in *Drosophila* showed that this gene obviously carries species-specific song information.

In this thesis the first step was to clone the *nonA* homologous gene of *Gryllus bimaculatus*, followed by the elaboration of a technique to achieve a highly efficient down-regulation of the gene in the nervous system of the cricket. The inhibition was assessed semiquantitatively both on mRNA level and (by using a NONA-antibody, which was assembled within the framework of this thesis) on protein level. Three parameters were evaluated to reveal the RNAi effects on the calling song of the cricket: the syllable period relative to the temperature, the maximum number of syllables per chirp and the daytime calling activity. In addition, the *nonA* ortholog of *Gryllus bimaculatus* was transformed into *Drosophila melanogaster nonA* mutants. The transgenic flies were analysed with respect to their survival rate and their phototactic behaviour, since these parameters allow drawing conclusions about the functional conservation of the *nonA* gene between *Gryllus bimaculatus* and *Drosophila melanogaster*.

The evaluation of the effect induced by RNAi showed a strong decrease of *nonA*-mRNA and NONA-Protein in crickets which had been treated at subadult stage, generally not leading to the detection of any product. When crickets had been treated as adults, a strong decrease of *nonA*-mRNA and NONA-protein could be found. This effect, however, rarely led to nondetection of these products.

The analysis of the calling song of *nonA*-RNAi-treated crickets, revealed that the duration of the syllable period was not influenced by the "knock-down" of the gene, but that the inhibition had a certain impact on the maximum number of syllables per chirp, as *nonA*-dsRNA-injected crickets produced significantly less 3-syllable chirps and significantly more 4- and 5-syllable chirps. Differences in the daytime calling activity between *nonA*-dsRNA-injected crickets and control groups could not be verified. The calling activity of all groups reached its peak in the first quarter of the night and significantly differed from the low calling activity during the remaining quarters of the day. Although the activity of all animals reached

its peak during the first quarter of the night, there seems to be a trend that this rhythmical behaviour was less pronounced in *nonA*-dsRNA-injected crickets.

Drosophila melanogaster mutants, which had been transformed with the *nonA* ortholog of *Gryllus bimaculatus*, increased their survival by 27% to 340%. In addition, the positive phototactic behaviour was slightly increased in all tested animals - this effect, however, remained marginal. Nevertheless, the *nonA* gene seems to be at least partly functionally conserved between *Gryllus bimaculatus* and *Drosophila melanogaster*.

Keywords: *Gryllus bimaculatus*, calling song, RNAi, *nonA*

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
ABKÜRZUNGEN	9
1. EINLEITUNG.....	13
1.1 ALLGEMEINER TEIL	13
1.1.1 <i>Akustische Kommunikation bei Gryllus bimaculatus</i>	13
1.1.2 <i>Ansatz über Kandidatengene</i>	15
1.1.3 <i>Das nonA-Gen</i>	16
1.1.4 <i>RNA-Interferenz (RNAi)</i>	17
1.2 ZIELE DIESER ARBEIT	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 CHEMIKALIEN	22
2.2 KULTURMEDIENTEN FÜR ESCHERICHIA COLI.....	23
2.3 VEKTOREN.....	24
2.4 BAKTERIENSTÄMME	27
2.5 FLIEGENSTÄMME (DROSOPHILA MELANOGASTER).....	28
2.6 GRILLEN (GRYLLUS BIMACULATUS)	28
2.7 AUFNAHMEGERÄTE	29
2.7.1 <i>Temperaturaufnahmen</i>	29
2.7.2 <i>Gesangsaufnahmen</i>	30
2.8 ISOLIERUNG VON DNA	31
2.8.1 <i>Isolierung von genomischer DNA</i>	31
2.8.2 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	31
2.8.2.1 <i>Plasmid-Präparation kleinvolumiger Bakterienkulturen (1 – 2 ml) (Mini- Präp)</i>	31
2.8.2.2 <i>Plasmid-Präparation großvolumiger Bakterienkulturen (50 - 250 ml) (Maxi-Präp)</i>	32
2.9 ISOLIERUNG VON RNA	32
2.9.1 <i>Isolierung von Gesamt-RNA</i>	32
2.9.2 <i>Isolierung von mRNA</i>	32
2.9.3 <i>Quantifikation und Qualitätskontrolle von RNA</i>	33
2.10 REINIGUNG UND TRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	33
2.10.1 <i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	33
2.10.2 <i>Ethanol-Fällung</i>	34
2.10.3 <i>Gelelektrophorese</i>	34
2.10.4 <i>Fragment-Isolierung aus Agarosegelen</i>	35
2.11 AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN.....	35
2.11.1 <i>Polymerase Ketten Reaktion (PCR)</i>	35
2.11.2 <i>Amplifizierung potentieller Kandidatengene mittels degenerierter Primer</i>	35
2.11.3 <i>touch-down PCR</i>	36
2.11.4 <i>Taq-Polymerase vermittelte PCR</i>	36
2.11.5 <i>Hot Start-PCR</i>	37

2.11.6 Pwo-Polymerase-vermittelte PCR	37
2.11.7 RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)	38
2.11.8 qRT-PCR (quantitative Reverse Transkriptase –PCR)	40
2.11.9 RACE-PCR.....	41
2.12 KOLONIERUNG	42
2.12.1 Herstellung von Vektoren zur direkten Klonierung von PCR-Produkten.....	42
2.12.2 Glätten überhängender Einzelstrangbereiche.....	42
2.12.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	43
2.12.4 Restriktion von Vektoren.....	43
2.12.5 Ligation.....	43
2.12.6 Transformation	44
2.12.7 α -Komplementation.....	44
2.13 cDNA-BIBLIOTHEK	44
2.13.1 sscDNA-Synthese (Erststrang cDNA-Synthese)	45
2.13.2 cDNA Anreicherung mittels PCR	45
2.13.3 Reinigung und Restriktion der cDNA	46
2.13.4 Größenfraktionierung der cDNA	46
2.13.5 Ligation der cDNA in den Vektor pDNR-LIB	47
2.13.6 Transformation des Ligationsprodukts.....	47
2.13.7 Titerbestimmung der Plasmidbibliothek.....	47
2.13.8 Amplifikation der cDNA-Bibliothek	48
2.13.9 Kolonie-Transfer.....	48
2.13.10 Markierung von Nukleinsäuren	49
2.13.11 Hybridisierung.....	49
2.13.11.1 Prähybridisierung	49
2.13.11.2 Hybridisierung.....	50
2.13.11.3 Waschen der Membranen	50
2.13.12 Isolierung positiver Klone.....	51
2.14 IN-SITU HYBRIDISIERUNG.....	51
2.14.1 Herstellung von Gefrierschnitten aus neuronalem Gewebe	51
2.14.2 Nachweis von spezifischen Transkripten durch Digoxigenin-markierte RNA-Sonden	52
2.14.3 Hybridisierung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	53
2.14.4 Nachweis hybridisierter Digoxigenin-Sonden.....	53
2.15 NONA ANTIKÖRPER.....	54
2.15.1 Expression des nonA Fragments im Vektor pMAL-c2X	54
2.15.2 Expression des NONA-Fusionsproteins	54
2.15.3 Reinigung des Fusionsproteins.....	55
2.15.4 Bradford-Assay.....	55
2.15.5 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	56
2.15.6 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung.....	57
2.15.7 Western Blot	57
2.15.8 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	58

2.16 RNA-INTERFERENZ	58
2.16.1 Herstellung von dsRNA	58
2.16.2 Injektion von dsRNA in Grillen	59
2.16.2.1 Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion adulter und subadulter männlicher Grillen	60
2.16.2.2 Injektion von dsRNA ins Abdomen subadulter und adulter männlicher Grillen	61
2.17 GENETISCHE ARBEITEN	61
2.17.1 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	61
2.17.1.1 Fliegenzucht	61
2.17.1.2 Eiablage	62
2.17.1.3 Dechorionisierung und Montage der Embryonen	62
2.17.1.4 Herstellung von Injektionskapillaren	62
2.17.1.5 DNA-Injektionslösung	63
2.17.1.6 Mikroinjektion	63
2.17.1.7 Isolierung transgener <i>Drosophila</i>	63
2.17.2 Kreuzungen von <i>Drosophila melanogaster</i>	64
2.18 VERHALTENSBIOLOGISCHE METHODEN BEI DROSOPHILA MELANOGASTER	67
2.18.1 Test auf positive Phototaxis	67
2.19 VERHALTENSBIOLOGISCHE METHODEN BEI GRYLLUS BIMACULATUS	67
2.19.1 Gesangsaufnahmen	67
2.19.2 Tageszeitliche Gesangsaktivität	69
3. ERGEBNISSE	70
3.1 ERSTMALS SEQUENZIERTE NUKLEOTIDSEQUENZEN VON GRYLLUS BIMACULATUS	70
3.1.1 Nukleotidsequenzen von Kandidatengenomen	70
3.1.1.1 Cacophony (CAC, <i>cac</i>)	70
3.1.1.2 <i>nonA</i> (NONA; <i>nonA</i>)	73
3.1.1.3 <i>fruitless</i> (FRU, <i>fru</i>):	76
3.1.2 Nukleotidsequenzen anderer Gene	78
3.1.3 Nukleotidsequenzen unbekannter Gene	78
3.2 dsRNA-APPLIKATION IM NERVENSYSTEM VON GRYLLUS BIMACULATUS	78
3.3 MOLEKULARER NACHWEIS VON RNA-INTERFERENZ IN GRYLLUS BIMACULATUS	81
3.3.1 Nachweis von <i>nonA</i> -mRNA	81
3.3.2 Nachweis von NONA-Protein	82
3.4 AUSWIRKUNGEN DER RNA INTERFERENZ AUF DEN LOCKGESANG VON GRYLLUS BIMACULATUS	82
3.4.1 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die Periodenlänge von Gesängen.	83
3.4.2 Individuelle Unterschiede in der Periodenlänge von Grillengesängen.	86
3.4.3 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die tagesperiodische Gesangsaktivität.	87
3.4.4 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die Silbenanzahl <i>pro</i> Chirp.	89
3.5 RETTUNG VON NONA-DROSOPHILA-MUTANTEN DURCH P-ELEMENT-VERMITTELTE KEIMBAHNTRANSFORMATION	92

3.5.1 Molekularer Nachweis von <i>Gryllus bimaculatus nonA</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	92
3.5.1.1 Nachweis von <i>nonA</i> -mRNA	92
3.5.1.2 Nachweis von NONA-Protein.....	93
3.5.2 Überlebensraten transgener <i>Drosophila melanogaster</i>	94
3.5.3 Test auf positive Phototaxis transgener <i>Drosophila melanogaster</i>	96
4. DISKUSSION.....	98
4.1 KANDIDATENGENE FÜR DIE AKUSTISCHE KOMMUNIKATION IN <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i>	98
4.2 RNAi-APPLIKATION IM NERVENSYSTEM VON <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i>	99
4.3 MOLEKULARER NACHWEIS VON RNAi IM NERVENSYSTEM VON <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i>	100
4.4 VERHALTENSÄNDERUNGEN BEI <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i> NACH NONA-DSRNA INJEKTION...	101
4.4.1 Auswirkungen auf die Silbenperiode.....	101
4.4.2 Auswirkungen auf die maximale Silbenzahl pro Chirp	103
4.4.3 Auswirkungen auf die tageszeitliche Gesangsaktivität	104
4.5 RETTUNG DER <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> NONA-NULLMUTANTE MIT DEM NONA-HOMOLOGEN GEN AUS <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i>	106
4.5.1 Überlebensfähigkeit transgener <i>Drosophila melanogaster</i>	106
4.5.2 Test auf positive Phototaxis transgener <i>Drosophila melanogaster</i>	107
4.6 AUSBLICK.....	108
5. ANHANG.....	109
5.1. NUKLEOTIDSEQUENZEN VERWENDETER PRIMER	109
5.2. NUKLEOTIDSEQUENZEN NICHT WEITER BEARBEITETER GENE.....	115
5.2.1 <i>cathepsin B</i> ähnliche Sequenz:	115
5.2.2 <i>foraging</i> ähnliche Sequenz.....	115
5.2.3 <i>Bub3</i> ähnliche Sequenz.....	116
5.2.4 <i>AP-2 sigma</i> ähnliche Sequenz	116
5.2.5 <i>Muscle LIM</i> ähnliche Sequenz.....	117
5.2.6 <i>posphatidylserine receptor</i> ähnliche Sequenz	117
5.2.7 <i>TCP-1 subunit</i> ähnliche Sequenz.....	117
5.2.8 <i>Yippee interacting protein 2</i> ähnliche Sequenz	118
5.3. NUKLEOTIDSEQUENZEN VERWENDETER DSRNAs.....	118
5.3.1 Nukleotidsequenz der verwendeten <i>eGFP-dsRNA</i> (ohne T7-Sequenzen).....	118
5.3.2 Nukleotidsequenz der verwendeten <i>nonA-dsRNAs</i> (ohne T7-Sequenzen)	119
5.4. NUKLEOTIDSEQUENZEN DES VERWENDETEN P-ELEMENTS (OHNE ERKENNUNGS-SEQUENZEN)	119
5.5 BILDER VON <i>GRYLLUS BIMACULATUS</i>	120
5.5.1 Bilder von wildtypischen <i>Gryllus bimaculatus</i>	120
5.5.2 Bilder von weißäugigen <i>Gryllus bimaculatus</i>	120
5.6 BILDER DER <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> P[G.B.NON A]-TRANSFORMANTEN	121
LITERATURVERZEICHNIS	122
DANKSAGUNG	131

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B(p)	Basen(paare)
BSA	Bovine Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>c</i> omplementary <i>D</i> NA)
cfu	colony forming unit
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
etc.	et cetera
EST	<u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>ce</u> <u>tag</u>
g	Gramm
x g	Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m / s ²)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

i.a.R.	in aller Regel
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
KAc	Kalium-Acetat
kV	Kilovolt
l	Liter
LR	Leserahmen
M	molar
μ F	Mikrofarad
max.	maximal
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mol	Mol
msek	Millisekunden
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid/e
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD _{xxx}	Extinktion bei der indizierten Wellenlänge _{xxx} und einer Schichtdicke von 1 cm
p.A.	pro analysis
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
sog.	sogenannt(e)
sscDNA	einzelsträngige komplementäre DNA (single stranded cDNA)
ssRNA	einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate <u>E</u> DTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur doppelsträngiger Nukleinsäuren
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<u>u</u> nit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt
x	-fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactosid
z.T.	zum Teil
~	ungefähr, zirka
%	Prozent
°C	Grad Celsius
[...] _i	intrazelluläre Konzentration
Ω	Ohm

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Nukleotide innerhalb der Nukleinsäuresequenzen sind durch die Anfangsbuchstaben ihrer Basen bezeichnet:

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

Im Laufe der Evolution hat sich eine Vielzahl von Formen der Kommunikation entwickelt, die situationsabhängig eingesetzt werden und eine entscheidende Rolle im intra- sowie interspezifischen Verhalten von Tieren und Menschen spielen. Dabei liegt jeder Art von Kommunikation ein Sender-Empfänger-Prinzip zugrunde, nach welchem jedes Signal erst dann einen Sinn ergibt, wenn ein Empfänger auf Grundlage der Information des Senders sein Verhalten anpassen kann. Dabei müssen sowohl Sender wie auch Empfänger mögliche Kosten (z.B. Erkennung/Ortung durch einen Räuber) gegen den zu erwartenden Nutzen (z.B. Partnerfindung) abwägen. Damit ein Signal evolutionsstabil ist, muss der (bevorzugte) Empfänger einen Nutzen aus dem Signal ziehen können, der letztendlich auch dem Sender zugute kommt (Bradbury & Vehrenkamp 1998). Eine häufig im Tierreich zu beobachtende Kommunikationsart ist die akustische Kommunikation im Rahmen der Partnerfindung. Bei vielen Arten hat diese sexuelle Kommunikation einen entscheidenden Einfluss auf die Partnerwahl, da der Empfänger durch das Signal oftmals Rückschlüsse auf Faktoren wie z.B. genetische Qualität, Gesundheitszustand oder Lokalisation des Senders erhält. Oft werden dabei situationsabhängig unterschiedliche Signale gesendet (z.B. Signale, um Paarungspartner aus großen Entfernungen anzulocken (Lokalisation), oder um angelockte Paarungspartner von der eigenen Kompatibilität und genetischen Qualität zu überzeugen), die dennoch den gleichen Endnutzen hervorbringen sollen. Dieser Endnutzen ist die Weitergabe der eigenen Gene in die nächste Generation, also der Fortpflanzungserfolg des Individuums (= Fitness). Das Paarungsverhalten von *Gryllus bimaculatus* stellt in diesem Zusammenhang ein hervorragendes Beispiel dar.

1.1.1 Akustische Kommunikation bei *Gryllus bimaculatus*

Die männlichen Grillen benutzen verschiedene Gesangstypen: zum Einen den Lockgesang, der einem entfernten Weibchen die Anwesenheit und Paarungsbereitschaft eines artigen Männchens signalisiert; zum Anderen den Werbegesang, der das in unmittelbarer Nähe befindliche Weibchen von den qualitativen Eigenschaften des Männchens überzeugen soll. Daneben existiert noch ein dritter Gesang, der bei territorialen Auseinandersetzungen eingesetzt wird (Alexander 1961; Zuk 1988; Weber & Thorson 1988; Cade 1989). Der

Lockgesang stellt somit das erste Kommunikationssignal im Paarungsverhalten von *Gryllus bimaculatus* dar und erreicht den Empfänger im Unterschied zum Werbegesang ohne jegliche zusätzlichen Signale, wie z.B. Pheromone oder taktile Reize. Der Gesang wird von einem neuronalen Netzwerk im Meso- und Metathorakalganglion gesteuert (Huber 1964, Hennig & Otto 1996). Die Entscheidung, welcher Gesang wann produziert wird, unterliegt jedoch der Kontrolle durch die Pilzkörper im Gehirn (Supraoesophagealganglion) (Huber 1964). Da es sich beim Lockgesang der männlichen Grillen um ein angeborenes Merkmal handelt, das bei der Partnerfindung von höchster Bedeutung ist, sollte dieses Merkmal sehr stabil gegenüber normalen Umweltschwankungen sein. Daraus folgt, dass die umweltbedingte Variabilität innerhalb einer Population klein sein sollte. Da der Lockgesang einem starken stabilisierenden Selektionsdruck unterworfen ist, kann zudem angenommen werden, dass die genotypische Variabilität gering ist. Der Lockgesang sollte also ein besonders robustes, wenig variables arttypisches Merkmal darstellen. In den Arbeiten von Popov & Shuvalov (1977), Pollack & Hoy (1981) sowie Gray & Cade (1999) wurde festgestellt, dass Weibchen beim Lockgesang signifikant den arttypischen Durchschnitts-Gesang präferieren, was die These des besonders robusten, wenig variablen arttypischen Merkmals untermauert.

Es sind genau diese Eigenschaften, die den Lockgesang von *Gryllus bimaculatus* für verhaltensgenetische Untersuchungen interessant machen, da sich Veränderungen und Variationen von komplexen Vorgängen besser quantifizieren lassen, wenn diese zuvor in kleinere definierbare Verhaltensweisen oder -aspekte zerlegt werden können. Neben verhaltensbiologischen und physiologischen Ansätzen gewinnen daher zunehmend auch (molekular-) genetische Fragestellungen an Bedeutung. Basierend auf den Erfahrungen und Erkenntnissen aus Studien an *Drosophila melanogaster* untersucht man genetische Grundlagen von Entwicklung und Verhalten bereits an einer Vielzahl anderer Insekten (*Apis mellifera* (Beye et al. 2003), *Manduca sexta* (Wise et al. 2002), *Tribolium castaneum* (Tomoyasu 2004), *Cupiennius salei* (Schoppmeier & Damen 2001), *Gryllus bimaculatus* (Miyawaki 2004, Mito et al. 2007)). Aufgrund fehlender Sequenzinformationen ist man bei der Arbeit mit sog. Nicht-Modellorganismen (z.B. *Gryllus bimaculatus*) häufig immer noch auf die Datenbanken und die Gen-/Sequenzinformationen bereits sequenzierter Organismen, wie z.B. *Drosophila melanogaster*, angewiesen. Ein Ansatz, vielversprechende Gene in Nicht-Modellorganismen ausfindig zu machen, ist der über sog. Kandidatengene.

1.1.2 Ansatz über Kandidatengene

Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, die möglicherweise Assoziationen mit dem Auftreten eines bestimmten Phänotyps aufweisen. Ein Gen, von dem vermutet wird, dass es einen Einfluss auf den Gesang von Grillen hat, wird im Rahmen der Untersuchung seiner Auswirkungen auf den Gesang als Kandidatengen bezeichnet. Bei nicht sequenzierten Modellorganismen bietet es sich an, anhand bereits analysierter Gene aus nahe verwandten Arten nach homologen Sequenzen im gewählten Modellorganismus zu suchen.

Jede Zelle verfügt über die gleiche genetische Grundausstattung; daher muss man davon ausgehen, dass an der Entwicklung jedes einzelnen Organs ebenso wie an der Entwicklung komplexen Verhaltens mehrere Gene beteiligt sind, die einzeln einen quantitativen Beitrag zum Phänotyp leisten. Andererseits kann ein einzelner Gendefekt zu einem Phänotyp führen, der sich grundlegend vom „Wildtyp“ unterscheidet. Die meisten der bereits analysierten Verhaltensgene wurden aufgrund ihres durch Einzelgenmutation entstandenen Phänotyps isoliert. Die erste in *Drosophila* beschriebene Mutation wurde 1910 von Thomas Hunt Morgan entdeckt und spielt heute bei der Arbeit mit Reportergenen eine wichtige Rolle in der *Drosophila*-Genetik. Dabei handelt es sich um die sog. *white*⁺-Mutante, die weißäugige Fliegen hervorbringt. Während dieser Arbeit wurden bei (über den Zoofachhandel bezogenen) *Gryllus bimaculatus*, weißäugige Tiere entdeckt (siehe 5.5.2). Die Mutanten wurden isoliert und befinden sich derzeit in der arbeitsgruppeneigenen Zucht von Regina Lübke.

Grundsätzlich stellen Einzelgen-Mutanten ein effizientes Mittel dar, um Verhaltensgene zu analysieren (vgl. Übersichtsartikel von Greenspan 1997, Yamamoto et al. 1997 und Peixoto & Hall 1998). Durch die Selektion von Verhaltensmutanten wurde eine große Anzahl von Genen mit pleiotroper Funktion gefunden, die das Paarungsverhalten im Allgemeinen sowie den Paarungsgesang im Speziellen beeinflussen. Unter diesen Genen finden sich viele Ionenkanal-Gene wie z.B. *cacophony* (von Schilcher 1976), *paralytic* (Loughney et al. 1989), *temperature-induced-paralyticE* (Feng et al. 1995) und *slowpoke* (Atkinson et al. 1991). Neben Ionenkanal-Genen findet man hauptsächlich Gene, die das neuronale Netzwerk, sowie die Genexpression und RNA-Verarbeitung steuern. Die derzeit am interessantesten erscheinenden Gene dieser Gruppe sind: *no-on-transientA* (Kulkarni et al. 1988), *period* (Kyriacou & Hall 1980, 1982), *fruitless* (Gailey & Hall 1989, Villella et al. 1997) und *doublesex* (Villella & Hall 1996). Das *no-on-transientA*-Gen (*nonA*) von *Drosophila melanogaster* prägt dabei als einziges Gen dieser Gruppe durch eine Punktmutation einen Gesangsphänotyp aus, der einer nahe verwandten Art (*Drosophila virilis*) gleicht (Campesan et al. 2001).

1.1.3 Das *nonA*-Gen

Das *no-on-transientA*-Gen (*nonA*) ist von besonderem Interesse bei der Untersuchung der genetischen Grundlagen von Gesängen, da bekannt ist, dass Punktmutationen in der codierenden Region des Gens die Eigenschaften des männlichen Balzgesangs bei *Drosophila melanogaster* beeinflussen (Rendahl et al. 1992). Darüber hinaus legen Gentransfer-Experimente des *Drosophila virilis nonA*-Gens in *Drosophila melanogaster nonA*-Mutanten durch Campesan et al. (2001) die Vermutung nahe, dass das Gen artspezifische Informationen des Balzgesangs enthält, da einige der Merkmale des *Drosophila virilis*-Gesangs bei *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden. Das *nonA*-Gen ist auch eine mögliche Quelle von Gesangsunterschieden zwischen verschiedenen zur *Drosophila virilis*-Gruppe gehörenden Arten, da es auf dem selben X-chromosomalen Abschnitt liegt wie Gene, die größere Unterschiede zwischen den Gesängen von *Drosophila virilis* und *Drosophila littoralis* verursachen (Hoikkala et al. 2000; Päällysaho et al. 2001).

Das *nonA*-Gen codiert für ein Protein, das höchstwahrscheinlich RNA-bindende Eigenschaften besitzt (Jones & Rubin 1990). Die Mutation dieses Gens kann Einfluss auf die Lebensfähigkeit (Stanewsky et al. 1993), das Sehvermögen (Hotta & Benzer 1969) sowie den männlichen Balzgesang (Kulkarni et al. 1988) von *Drosophila melanogaster* haben. Analysen einzelner Mutationen haben gezeigt, dass eine Mutation der kodierenden Region, die den Gesang beeinflusst, gleichzeitig auch das Sehvermögen beeinflusst, nicht aber umgekehrt (Rendahl et al. 1992, 1996, Stanewsky et al. 1996). NONA wird ubiquitär in allen Entwicklungsstadien exprimiert (Rendahl et al. 1992). Das Protein enthält zwei interne Domänen, die starke Homologien mit der Familie der RNA Recognition Motiv Proteins (RRM) aufweisen. Die RRM-Domänen sind einer Reihe Einzelstrang-Nukleinsäure-bindender Proteine gemein. Das deutet darauf hin, dass *nonA* eine Rolle bei der Kontrolle der Transkriptions-Aktivität spielt. Das mutierte Allel dieses Gens, ‚dissonance‘ bzw. *nonA^{diss}* ist gekennzeichnet durch eine nicht-synonyme Substitution an der Stelle 548 und ruft bei *Drosophila melanogaster* einen abnormalen Balzgesang hervor. Merkmale dieses Balzgesangs sind zunehmende Polyzyklizität und große Amplituden (Kulkarni et al. 1988). Die erste RRM-Domäne (RRM1) ist für alle bekannten Funktionen von NONA nötig, und Mutationen in dieser Region rufen auch Defekte beim Balzgesang hervor (Rendahl et al. 1996, Stanewsky et al. 1996). Die N-terminale Region von NONA ist nur sehr schwach konserviert und repetitiv, während die zentrale und C-terminale Region unter den *Drosophila*-Arten konserviert ist (Besser et al. 1990, Jones & Rubin 1990, Campesan et al. 2001). Es kann vermutet werden, dass die repetitive Region in der codierenden Sequenz von *nonA* einen

Einfluss auf die Evolution/Ontogenese sekundärer sexueller Merkmale bei *Drosophila* hat (z.B. Balzgesang), da dies bereits für die Thr-Gly-repeat Region im *period*-Gen für *Drosophila melanogaster* gezeigt wurde (Wheeler et al. 1991).

1.1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Einblicke in die genetischen Grundlagen von Verhalten konnten bisher insbesondere durch Vergleiche von Sequenzvariabilität mit phänotypischer Variabilität, sowie durch Manipulation von Verhalten durch Gentransfer-Experimente erlangt werden (Campesan et al 2001, Manoli et al. 2005). Besonders vielversprechend sind jedoch epigenetische Ansätze, die das Ziel verfolgen, einzelne Gene kurzfristig und unterschiedlich stark herunter zu regulieren („knock-down“). Der besondere Vorteil dieser Methode besteht unter anderem darin, dass auch bisher schwer zu untersuchende Gene, z.B. Letalfaktoren, untersucht werden können. Zudem kann man den Zeitpunkt der Genausschaltung variabel festsetzen und ist so in der Lage, Gene in allen Entwicklungsstadien zu analysieren, ohne dabei ins Genom eingreifen zu müssen. Der gezielte RNA-Interferenz (RNAi) vermittelte knock-down einzelner Gene erweist sich zunehmend als verlässliche Methode, die für mehr und mehr Organismen etabliert wird (*Apis mellifera* (Farooqui et al. 2004, Amdam et al. 2003, 2006), *Tribolium castaneum* (Bucher et al. 2002), *Schistocerca americana* (Dong & Friedrich 2005)).

Die Auswirkung von RNA-Interferenz wurde ohne Kenntnis des zugrundeliegenden Mechanismus erstmals von Napoli et al. (1990) als „co-suppression“ beschrieben. Beim Versuch, die Blütenfarbe von Petunien durch eine zusätzlich eingeschleuste Kopie des Dihydroflavonol-Reduktase-Gens zu intensivieren, stellte sich heraus, dass ein gegenteiliger Effekt zu beobachten war. Viele der behandelten Pflanzen prägten einen Phänotyp aus, der deutlich weniger stark gefärbte Blüten hervorbrachte, manche Blüten erschienen sogar vollkommen weiß. Ein ähnliches Phänomen wurde zwei Jahre später auch von Romano & Macino (1992) in *Neurospora crassa* beschreiben und als „quelling“ bezeichnet.

Erst 1998 wurde der Mechanismus durch die Arbeit von Andrew Fire und Craig Mello (Fire et al. 1998) als RNAi beschrieben und erkannt, dass allein doppelsträngige RNA (dsRNA) als Auslöser des Mechanismus fungiert. Dabei gelang es Fire und Mello, mit sehr hoher Effizienz spezifische Gene im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* herunter zu regulieren.

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus eukaryotischer Zellen, der unter Einfluss von RNA-Molekülen die Expression korrespondierender Gene herunterreguliert. Bei der RNAi handelt es sich um eine Methode des posttranskriptionalen Gen-Silencing, die zeitlich

und zum Teil auch räumlich begrenzt induziert werden kann. Um ein Gen mittels RNAi zu hemmen, wird doppelsträngige RNA (dsRNA) injiziert, deren antisense-Strang komplementär zu der mRNA des Gens („Zielgen“) ist. Im Cytoplasma wird die dsRNA von einer oder mehreren spezifischen Endonuclease/n, dem sog. Dicer-Komplex, erkannt und in 21-27 Nukleotide lange Fragmente, die sogenannte siRNA („small interference-RNA“) zerschnitten. Die siRNA-Fragmente sind durch 2 Nukleotide lange Überstände am 3'-Ende („sticky ends“) charakterisiert. Im weiteren Verlauf assoziieren die freien doppelsträngigen siRNAs mit weiteren Proteinkomponenten zum sog. RISC („RNA-induced silencing complex“), einem Ribonukleoprotein-Komplex (RNP). Die siRNA wird entwunden und die beiden komplementären Stränge voneinander gelöst. Je nach Stabilität der Duplex-Enden bleiben mehr antisense- oder mehr sense-RIS-Komplexe bestehen. Im Idealfall sollten möglichst viele Komplexe mit dem antisense-Strang stabil bleiben, da nur diese komplementär zum Zielgen sind und dementsprechend den „knock-down“ verursachen. Wird nun im Zellkern das Zielgen exprimiert und die mRNA synthetisiert, bindet sie im Cytoplasma an das im RISC gebundene komplementäre Fragment und wird von der im RISC enthaltenen Nuklease (Argonaute-2-Protein) zerschnitten. Die zerschnittene mRNA ist hochgradig instabil und wird schnell von zelleigenen Nukleasen abgebaut. Dies führt zu einer Hemmung der Translation, die im Extremfall zu einem Totalausfall der Proteinsynthese des entsprechenden Gens führen kann. Bei der RNAi handelt es sich eigentlich um einen Mechanismus, mit dem sich eukaryotische Zellen vor der Expression fremder, z.B. viraler Gene schützen (Waterhouse et al. 2001). Durch die Synthese doppelsträngiger RNA, die homolog zu den viralen Gen-Sequenzen ist, wird eine Expression der fremden Gene verhindert (Übersicht bei Scherer & Rossi 2003). Durch Injektion von dsRNA mit einem komplementären Strang zu einem im Genom des Versuchsorganismus enthaltenen Zielgen kann jedoch auch eine endogene Genexpression unterdrückt werden.

In diesem Zusammenhang sind Organismen, in denen die RNAi systemisch wirkt, d.h. sich im ganzen Organismus ausbreitet, von besonderem Interesse. Die Eigenschaft eines Organismus, systemisch oder lokal auf RNA-Doppelstrang (dsRNA) vermittelte RNAi zu reagieren, scheint dabei vom Vorhandensein des Membranproteins SID-1 abhängig zu sein (Winston et al. 2002, 2007; Feinberg & Hunter 2003). Außerdem scheint die Ribonuklease ERI-1 eine wichtige Rolle in diesem Prozess zu spielen. Organismen oder Zelltypen, in denen *eri-1*-homologe Gene gefunden wurden, zeigten keinen systemischen knock-down als Antwort auf applizierte dsRNA und siRNA (Kennedy et al. 2004, Meister & Tuschl 2004).

Unglücklicherweise gehört *Drosophila melanogaster* zu eben jenen Organismen, die ERI-1 exprimieren und gleichzeitig kein *sid-1*-homologes Gen besitzen. Da das Genom von *Gryllus bimaculatus* bisher nicht vollständig sequenziert wurde, kann man das Vorhandensein von ERI-1 nicht ausschließen. *Sid-1*-homologe Sequenzen wurden in Orthopteren bisher nur in der Heuschrecke *Schistocerca americana* gefunden (Dong & Friedrich 2005), *eri-1*-homologe Sequenzen konnten hingegen bisher nicht in Orthopteren nachgewiesen werden.

In Arthropoden hat die RNAi in den letzten Jahren besondere Bedeutung bei der Untersuchung von embryonalen Entwicklungsmechanismen erlangt (vgl. Bucher et al. 2002; He et al. 2006). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung von Genen, deren Totalausfall Letalität zur Folge hat. Da RNAi i.a.R. zu einem breiten Ausfallsspektrum führt, bedeutet dies, dass man je nach Modellorganismus und Gen Tiere erhält, die zwischen einem Totalausfall und dem Wildtyp liegen und so Rückschlüsse auf die „Richtung“ des jeweiligen Ausfalls gezogen werden können.

Als Methode der Charakterisierung von Genen in Nicht-Modellorganismen ist die Etablierung der RNAi bei Hymenopteren deutlich weiter fortgeschritten als bei Orthopteren. Dabei haben die verfügbaren Sequenzinformationen des jeweiligen Organismus einen entscheidenden Einfluss auf seine Attraktivität für RNAi-Experimente. Versuche, genetische Grundlagen arttypischen Verhaltens zu entschlüsseln, wurden daher vor allem bei der Honigbiene (*Apis mellifera*) durchgeführt. Farooqui et al. (2004) injizierten dsRNA, um eine Expression des Oktopamin-Rezeptors zu hemmen. Sie fanden im Verhaltensexperiment einen inhibierenden Effekt der Behandlung auf das olfaktorische Lernen, bei dem Oktopamin eine wichtige Rolle spielt. Amdam et al. (2003) reduzierten durch dsRNA-Injektion in Eier sowie in adulte Bienen die Menge an Vitellogenin-mRNA deutlich und zeigten 2006 darüber hinaus, dass sich eine Unterdrückung des Vitellogenin-Gens durch RNAi auch auf die gustatorische Empfindlichkeit von Arbeiterinnen auswirkt. Durch einen RNAi-induzierten knock-down zweier Hexamerin-Gene nahmen Zhou et al. (2006) sogar gezielt Einfluss auf die Differenzierung von der Arbeiterkaste zur Soldatenkaste bei Termiten (*Reticulitermes flavipes*).

Aber auch bei Orthopteren konnten Verhaltensgene durch RNAi bereits erfolgreich reguliert werden. Moriyama et al. (2008) konnten das *period*-Gen in *Gryllus bimaculatus* herunterregulieren und zeigen, dass bei der Mehrheit der behandelten Tiere die zirkadiane Rhythmik verloren geht. Takahashi et al. (2009) konnten durch das Herunterregulieren des *nos*-Gens das olfaktorische Langzeitgedächtnis von *Gryllus bimaculatus* beeinflussen.

Diese Pionierarbeiten zeigen, dass *Gryllus bimaculatus* potentiell als Modellorganismus für RNAi-basierte verhaltensgenetische Untersuchungen etabliert werden kann.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Da nicht nur die Entwicklung des Nervensystems genetisch kontrolliert wird, sondern auch die Funktionen der ausdifferenzierten Nervenzellen direkt von der Existenz spezifischer Genprodukte abhängen, ist die Frage interessant, welche Gene das Gesangsverhalten adulter Grillen in welcher Art und Weise beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich aus dieser Fragestellung die folgenden Ziele:

- Es sollten Kandidatengene für das Gesangsverhalten in *Gryllus bimaculatus* aufgespürt werden. Um die Anzahl von Kandidatengenen zu begrenzen, wurde der Fokus der Untersuchungen auf Gene gerichtet, die Homologien zu den Genen aufwiesen, die in *Drosophila melanogaster* ein solches Verhalten beeinflussen. Daher wurden eine Reihe vielversprechender PCR-Produkte sequenziert und mit Sequenzinformationen aus Genbanken verglichen.
- Darüber hinaus sollte eine Methode entwickelt werden, mit der in *Gryllus bimaculatus* gefundenen Gene mittels RNAi im Nervensystem adulter Tiere herunterreguliert werden können. Dazu wurde den Versuchstieren unter CO₂-Betäubung dsRNA mittels Mikrokapillare direkt ins Metathorakalganglion injiziert.
- Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den RNAi-Effekt auf die Expression der Ziel-RNA und der entsprechenden Proteine molekularbiologisch zu belegen. Dies geschah auf RNA-Ebene ebenso wie auf Proteinebene.
- Außerdem sollte der RNAi-Effekt auf Verhaltensebene belegt werden, um daraus Rückschlüsse auf den Einfluss der getesteten Gene auf das akustische Verhalten männlicher Tiere bei *Gryllus bimaculatus* ableiten zu können. Daher wurden Lockgesänge unter standardisierten Bedingungen computergestützt erfasst und ausgewertet und anschließend mit entsprechenden Kontrollgruppen statistisch verglichen.

- Schließlich sollte überprüft werden, inwieweit das Kandidaten-Gen von *Gryllus bimaculatus* als funktionell verwandt (ortholog) zum *nonA*-Gen in *Drosophila melanogaster* angesehen werden kann. Dazu wurde das *nonA*-ähnliche Gen aus *Gryllus bimaculatus* in eine *nonA*-Nullmutante von *Drosophila melanogaster* eingesetzt. Anschließend wurde das Überleben und Verhalten der Fliegen getestet.

2. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen molekularen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt.

2.1 Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Boehringer (Ingelheim), Clontech (Heidelberg), Elf Atochem (Düsseldorf), GIBCO BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen). Enzyme und deren Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Biosciences (Freiburg), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), NEB (Schwalbach), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim) und segenetic (Göttingen) geliefert. Radionukleotide wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Proteine wurden auf die Nitrocellulose-Membran Protran der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) transferiert. Nukleinsäuren wurden auf Biobond plus Nylon-Membranen der Firma Sigma (Deisenhofen) transferiert. Für Autoradiographie und Chemilumineszenz wurden X-OMAT AR Röntgenfilme (Kodak) und ECL Hyperfilme (Amersham Biosciences) verwendet.

Alle Lösungen wurden mit entionisiertem und durch eine Milliporeanlage (Millipore, Hamburg) aufbereitetem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert. RNase-freie Lösungen wurden durch Zugabe von DMSO, Inkubation bei 37°C ü.N. und anschließendem Autoklavieren (20 min; 120°C) hergestellt.

2.2 Kulturmedien für *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertoni)-Medium:

10 g/l Baktotrypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Für LB Agar-Platten wurden 15 g/l Agar zugesetzt.

SOC-Medium:

5 g/l Hefeextrakt

20 g/l Baktotrypton

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM MgSO₄

20 mM Glukose

Rich-Medium mit Glukose:

10 g/l Baktotrypton

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

2 g/l Glukose

Alle Medien wurden autoklaviert (20 min; 121°C) und anschließend bei 4°C gelagert. Medien, die Agar enthielten, wurden vor dem Gießen der Platten in einer Mikrowelle erhitzt, bis der Agar vollständig gelöst war. Sobald das Medium auf 50°C abgekühlt war, wurden entsprechende Antibiotika zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenzen zugegeben. Nach dem Gießen in sterile Petrischalen wurden die Platten bei 4°C gelagert. Die Endkonzentration der Antibiotika (in Flüssig- sowie Agar-Medien) lag für Ampicilin, Chloramphenicol und Kanamycin bei jeweils 100 µg/ml. Sollte eine zusätzliche Selektion auf β -Galaktosidase-negative Klone durchgeführt werden, wurden die Platten unmittelbar vor Gebrauch mit 40 µl X-Gal 2 % (w/v) (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl, β -D-Galaktopyranosid) in Dimethylformamid sowie 4 µl IPTG (1 M; Isopropyl- β -D-thiogalactosid) in Wasser bestrichen.

2.3 Vektoren

pBluescript SK⁻

pBluescript SK⁻ wurde als Standardvektor für die Klonierung rekombinanter DNA verwendet.

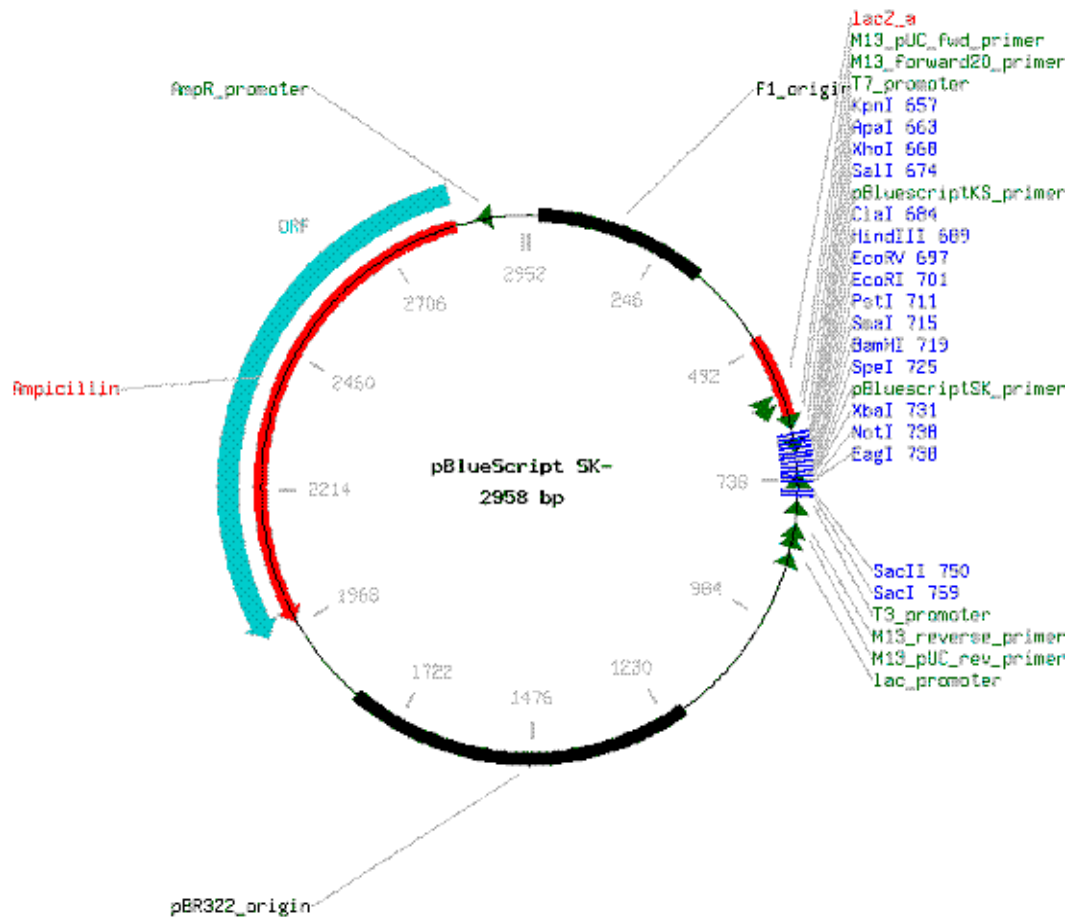


Abbildung 1: Vektor pBlueScript SK⁻

pCaSpeR hs-act

pCaSpeR hs-act wurde als Vektor für die P-Element-induzierte Transformation verwendet. Neben einen Hitzeschock Promotor (hsp70) besitzt dieser Vektor eine Aktin-Sequenz am 3'-Ende der P-Element Insertionsstelle, die die Proteinstabilität deutlich erhöht. Als Reportergen dient eine verkürzte Form des *white*⁺-Gens.

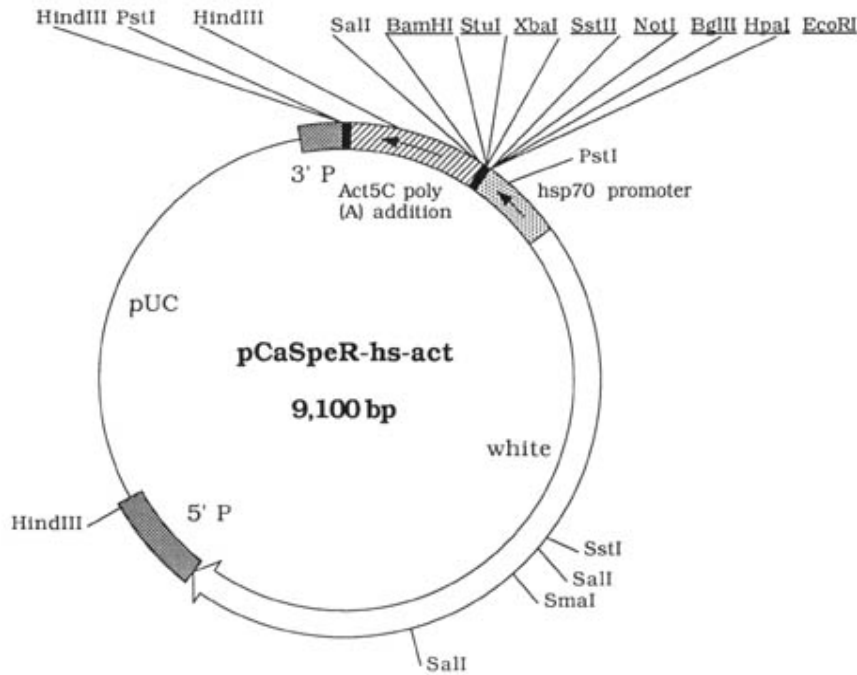


Abbildung 2: Vektor pCaSpeR-hs-act

pDrive

pDrive ist ein Vektor, der sich hervorragend für white/blue screening eignet und M13 Sequenzen für entsprechende Sequenzierungsprimer beinhaltet. Zudem wurde dieser Vektor für die direkte Transformation von PCR-Produkten verwendet, die mittels *Taq*-Polymerase erzeugt wurden (T-A bzw. U-A Transformation).

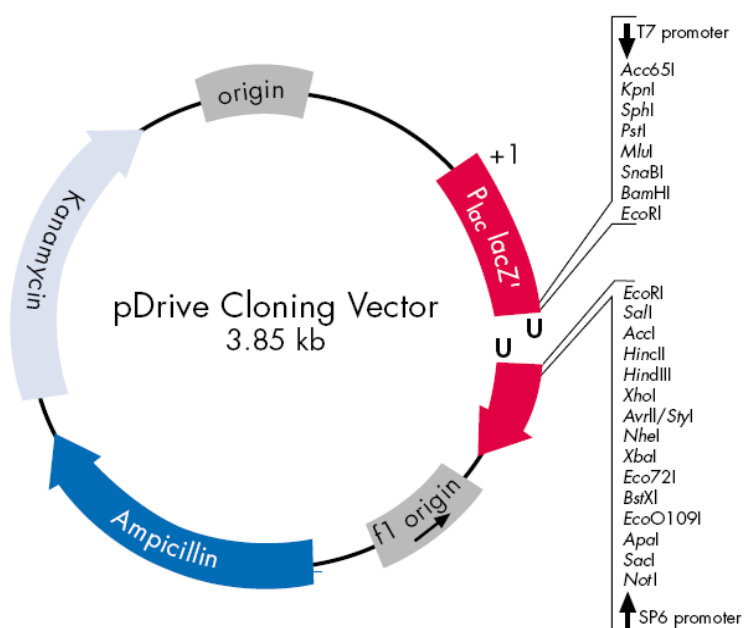


Abbildung 3: Vektor pDrive Cloning Vector

pLib

Bei pLib handelt es sich um einen Vektor, der speziell für die Archivierung von cDNA in cDNA-Bibliotheken eingesetzt wurde.

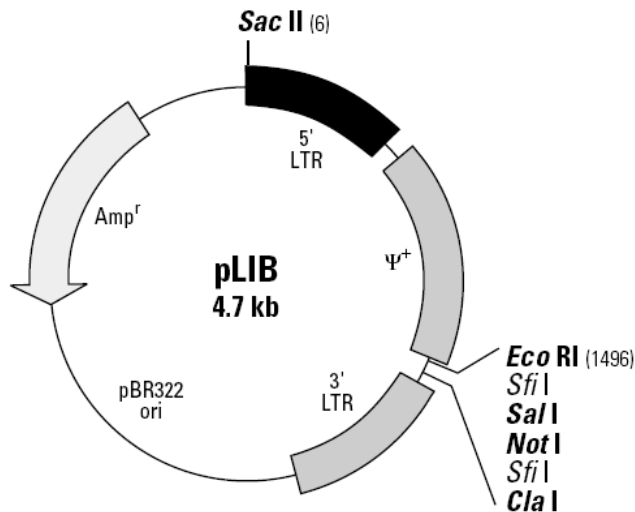


Abbildung 4: Vektor pLIB

pMal

Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen Expressionsvektor, der aufgrund seiner Maltosesequenz geeignet ist, gut lösliche Fusionsproteine zu exprimieren.

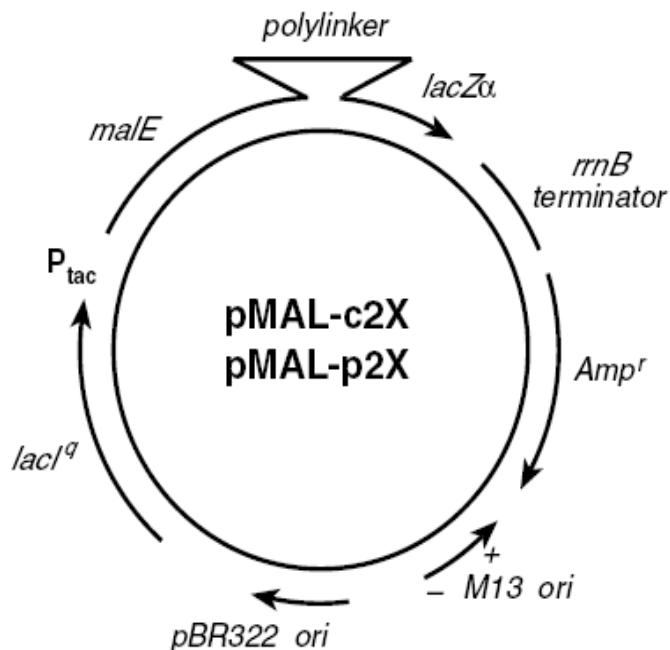


Abbildung 5: Vektor pMAL-c2X/p2X

p π 25.7wc

p π 25.7wc dient als Helferplasmid und wurde bei der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation koinjiziert. Es enthält den kodierenden Teil der Transposase, aber keine „inverted repeats“, ist selbst also nicht integrierbar.

2.4 Bakterienstämme**XL1-Blue:**

Escherichia coli XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^fZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)*].

Dieser Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet.

BL-21:

Escherichia coli BL21: *E. coli* B, F-, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r_B-m_B-), *gal λ* (DE3) [Codon⁺]

Dieser Stamm wurde zur Expression von Proteinen verwendet und als Alternative zu XL1-Blue bei Klonierungen eingesetzt.

EZ10

Escherichia coli: F- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), *80dlacZ Δ M15*, Δ *lacX74*, *endA1*, *recA1*, Δ (*ara*, *leu*)7697, *araD139*, *galU*, *galK*, *nupG*, *rpsL*, λ -T1R.

Diese Zellen wurden für die Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet. Bei diesen von der Firma Clontech vorbereiteten Zellen handelt sich um elektrokompente Zellen, die extrem hohe Transformationsraten erreichen.

2.5 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten genetischen Varianten von *Drosophila melanogaster*.

Tabelle 1: Genetische Varianten von *Drosophila melanogaster*

Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
<i>TM3 / TM6</i>	3. Chromosom, Balancer	Lindsley and Grell, 1968
<i>Tft / CyO</i>	2. Chromosom, Balancer	Lindsley and Grell, 1968
<i>FM7 / Basc</i>	X-Chromosom, Balancer	Lindsley and Zimm, 1992
<i>w¹¹¹⁸</i>	Stamm für Keimbahntransformationen	Lindsley and Grell, 1968
<i>Oregon R</i>	Wildtypstamm	Lindsley and Grell, 1968
P[132Xhr11-1-A]	3. Chromosom, entspricht Gesamttretung	Stanewsky, 1993
P[235R11 SacII] Linie 4	3. Chromosom, entspricht <i>nonA</i> ⁻	Jones und Rubin, 1990
P[235R11 SacII] Linie 7	3. Chromosom, entspricht <i>nonA</i> ⁻	Jones und Rubin, 1990
P[211S12-23]	2. Chromosom	Jones und Rubin, 1990
<i>T(1;4)9e2-10</i>	14C1 zur Basis des 4. Chromosoms; letal	Stanewsky, 1993
<i>nonA^{H2}</i>	hypomorphes Allel, lebensfähig	Heisenberg, 1972
<i>nonA^{P14}</i>	hypomorphes Allel, lebensfähig	Jones und Rubin, 1990
<i>nonA^{p60}</i>	hypomorphes Allel, lebensfähig	Jones and Rubin, 1990
P[<i>G.b.nonA</i> A]	3. Chromosom, <i>nonA</i> aus <i>Gryllus bimaculatus</i>	diese Arbeit, (siehe auch 5.6)
P[<i>G.b.nonA</i> B]	3. Chromosom, <i>nonA</i> aus <i>Gryllus bimaculatus</i>	diese Arbeit, (siehe auch 5.6)
P[<i>G.b.nonA</i> C]	2. Chromosom, <i>CyO</i> (homozygot letal), <i>nonA</i> aus <i>Gryllus bimaculatus</i>	diese Arbeit, (siehe auch 5.6)

2.6 Grillen (*Gryllus bimaculatus*)

Die für diese Arbeit verwendeten Grillen der Art *Gryllus bimaculatus* wurden teils als Larven bzw. subadulte Tiere über den Zoohandel bezogen, teils stammten sie aus der arbeitsgruppeninternen Zucht. Die Tiere wurden in rechteckigen Plastikterrarien mit abnehmbarem Gaze-Deckel gehalten bzw. gezüchtet. Als Futter wurde ausschließlich eine Mischung aus Vogelfutter (Claus Fett Alleinfutter TypIII der Firma Claus GmbH,

Limburgerhof) und Haferflocken im Verhältnis 1:1 verwendet. Um die Tiere mit Flüssigkeit zu versorgen, wurden die Kleinterrarien mit wassergefüllten Petrischalen bestückt, in die ein Zellstofftuch gelegt wurde, um ein Ertrinken der Tiere zu vermeiden. Als Versteckplätze dienten Eierkartons, die zu mehreren übereinander gestapelt wurden.

Grillen, die für die Gesangsaufnahmen bestimmt waren, wurden, sobald es anhand äußerer Merkmale möglich war, nach Geschlechtern getrennt. Für Verhaltensversuche wurde ausschließlich das Verhalten von Tieren aus der arbeitsgruppeninternen Zucht von Regina Lübke ausgewertet, da sich die Werte zugekaufter Tiere zuvor immer wieder als Ausreißer in den Auswertungen bemerkbar gemacht hatten.

2.7 Aufnahmegeräte

2.7.1 Temperaturaufnahmen

Die Temperatur wurde über ein digitales 4-Kanal-Thermometer (Typ SE309) der Firma Conrad Electronic direkt in einen PC übertragen. Die Temperaturmessungen erfolgten in Intervallen von 5 bzw. 30 Sekunden über 4 TP-K01-Sensoren, die je nach Versuchsaufbau an unterschiedlichen Orten im Aufnahmeraum platziert wurden. Die Messungenauigkeit des Gerätes beträgt im Bereich zwischen -200 und +200 °C +/- 0,2% bei einer Auflösung von 0,1°C. Die Temperaturdaten wurden mit Hilfe der mitgelieferten Software (Four Channel Thermometer Software, Version 2.2.0.0) in *.txt-Dateien übertragen und mit Microsoft Excel ausgewertet. Abbildung 6 zeigt exemplarisch einen Temperaturverlauf, gemessen an einem der vier TP-K01 Sensoren an 4 aufeinanderfolgenden Tagen.

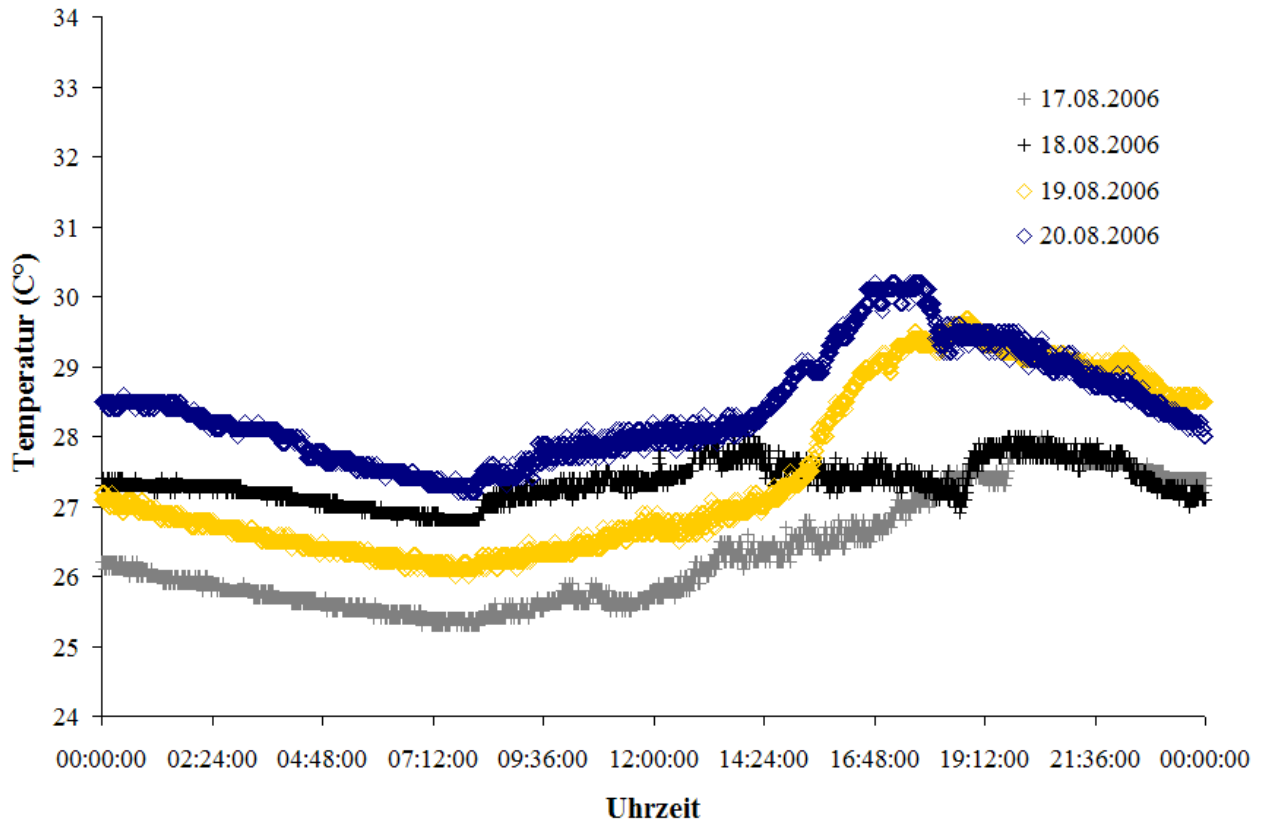


Abbildung 6: 24h - Temperaturverlauf (17. - 20. August 2006). Graue Kreuze: 17.08.2006, schwarze Kreuze: 18.08.2006, gelbe Rauten: 19.08.2006, blaue Rauten: 20.08.2006.

2.7.2 Gesangsaufnahmen

Die Gesänge der Grillen wurden über ein Mikrofon (Ansteckmikrofon, Conrad Electronic) in einen Vorverstärker übertragen (Vivanco, MA222), der das Signal in das Datenübertragungsmodul (analog auf digital) SCB-68 der Firma National Instruments weiterleitete. Von dort wurde das Signal an die PCI-6224 Karte (National Instruments, Austin, Texas, USA) im Computer übertragen. Die Lab View 7-Software zur Steuerung der Aufnahme von Gesängen wurde von PD Dr. Matthias Hennig entwickelt. Die Auswertung der übertragenen Daten erfolgte primär ebenfalls mit Lab View 7 Programmen, die von Matthias Hennig und Daniela Neuhofer speziell für die Auswertung von Gesängen geschrieben wurden.

2.8 Isolierung von DNA

2.8.1 Isolierung von genomischer DNA

Kernreiches Gewebe (entsprechend einer Menge von 30 adulten *Drosophila*) wurde in ein auf Eis gebettetes 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und das Gewebe mechanisch in 200 µl des Puffers A (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% SDS) homogenisiert. Danach wurden noch einmal 200 µl Puffer A hinzugefügt und weiter für etwa 1-2 Minuten homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 30 min. Danach wurden 800µl des Puffers B (40 ml 5M KaAc; 100 ml 6M LiCl₂) hinzugefügt, gemischt und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10000 x g; 15 min; RT) wurde der Überstand vorsichtig in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Durch Zentrifugation (10000 x g; 15min; RT) wurde die DNA pelletiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100µl TE resuspendiert. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA

2.8.2.1 Plasmid-Präparation kleinvolumiger Bakterienkulturen (1 – 2 ml) (Mini- Präp)

2 ml des Bakterienkulturmediums mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Kolonie rekombinanter Bakterien beimpft und ü.N. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien aus 1,5 ml Kulturflüssigkeit wurden abzentrifugiert (14.000 x g; 4°C; 5 min; Micro200R, Firma Hettich, Tuttlingen), in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und mit 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH; 1 % SDS) 5 min bei RT lysiert. SDS, Proteine und hochmolekulare DNA wurden durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M KAc pH 4,8) 5 min auf Eis gefällt. Bei 14.000 x g (4°C; 15 min; Micro200R, Firma Hettich, Tuttlingen) wurden die gefällten Bestandteile abzentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden abgenommen und die Nukleinsäuren in 1 ml Ethanol (abs.) bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung (ca. 20 min bei 37°C) wurden die Nukleinsäuren in 10–50 µl H₂O bidest. oder TE-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

2.8.2.2 Plasmid-Präparation großvolumiger Bakterienkulturen (50 - 250 ml) (Maxi-Präp)

Plasmid-Präparationen großvolumiger Bakterienkulturen wurden mit dem HiSpeed Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9 Isolierung von RNA

2.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das TRIzol®-Reagenz der Firma Invitrogen verwendet. TRIzol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die eine Weiterentwicklung der *single step* RNA-Isolationsmethode von Chomczynski und Sacci (Chomczynski & Sacci 1987) darstellt.

Bei der Homogenisation des Gewebes mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax, Firma IKA, Staufen) in TRIzol-Lösung werden die Zellen lysiert und in ihre Zellbestandteile zerlegt. Die Integrität der RNA wird dabei durch TRIzol erhalten. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation (14000 x g, RT) wird die Lösung in 3 Phasen separiert: eine organische (Phenol/Chloroform) Phase, die Proteine enthält, eine Interphase, in der die DNA separiert, sowie eine RNA enthaltende wässrige Phase. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und die RNA mit Isopropanol (0,5 ml/1 ml TRIzol eingesetztes Anfangsvolumen) 10 min bei RT gefällt. Anschließend wird die RNA für 20 min bei 10.000 x g und RT pelletiert.

Die RNA wird als weißes bis leicht gelbliches Pellet sichtbar. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 75%-igem Ethanol (1 ml pro anfangs eingesetztem TRIzol) gewaschen und anschließend kurz an der Luft getrocknet (kein vollständiges Trocknen).

Das Pellet wird in RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 55°C inkubiert, um die Löslichkeit zu erhöhen.

2.9.2 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde mit dem Oligotex mRNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der

Hybridisierung des Poly-Adenosin-Endes der mRNA an Thymin-Oligomere, die an eine Matrix gebunden sind.

Die mRNAs wurden in der Matrix gebunden, wohingegen alle anderen Fragmente in mehreren Waschschritten aus der Matrix gelöst wurden. Die mRNAs wurden schließlich durch Zugabe von 20-100 µl 70°C heißen OEB-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 7.5) eluiert.

2.9.3 Quantifikation und Qualitätskontrolle von RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (Lambda-Photometer, Perkin-Elmer, Fermont, USA) durch Absorption der Lösung bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 44 µg RNA pro ml. Absorptionen unter 0,20 wurden aufgrund von hohen Ungenauigkeiten bei geringen Konzentrationen nicht photometrisch bestimmt.

Die Reinheit der RNA wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm (A_{260}/A_{280}) bestimmt. Aufgrund der hohen pH-Abhängigkeit bei der Messung der Absorptionsverhältnisse wurde die Absorption in 10 mM Tris-HCl bei einem pH von 7,5 durchgeführt. Hochreine RNA in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 hat ein Absorptionsverhältnis (A_{260}/A_{280}) von 1,9 – 2,1.

2.10 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.10.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc. wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus 1 x TE-gesättigtem Phenol und Chloroform versetzt. Die Phasen wurden 2 min gut gemischt (vortexen) und zur Trennung zentrifugiert (14.000 x g, RT, 3 min). Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt (vortexen) und anschließend zentrifugiert (14.000 x g, RT, 3 min), um restliches Phenol zu entfernen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit dem 2,5-fachen an Ethanol versetzt, um die Nukleinsäuren zu präzipitieren.

2.10.2 Ethanol-Fällung

Die DNA-Lösung wurde auf eine KAc-Konzentration von 0,3 M eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (abs.) versetzt und gemischt. Dieser Ansatz wurde entweder sofort zentrifugiert, oder die DNA bei – 20°C für 30 min gefällt. Durch Zentrifugation (14.000 x g, 4°C, 15-40 min) wurde die DNA pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der DNA-Menge: je geringer konzentriert eine Lösung ist, desto länger sollte zentrifugiert werden. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 37°C für ca. 20 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10–50 µl H₂O bidest. oder TE-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gelöst bei -20°C gelagert.

2.10.3 Gelelektrophorese

Nukleinsäure-Fragmente wurden in Agarosegelen von 0,75-1,5 % Agarose in 1 x TAE aufgetrennt. Die Agarosekonzentration des Gels richtet sich nach den Fragmentgrößen, die getrennt werden sollten (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Agarosegelkonzentrationen und DNA-Fragment Trennung.

Agarosekonzentration [%] (w/v)	Fragmentlängen [Bp]
0,75	2000 - 9000
1,0	300 - 2000
1,5	< 300

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 5 x Probenpuffer (100 mM EDTA; 20 % (w/v) Ficoll 400; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 0,01 % (w/v) Xylencyanol) versetzt. Der 1kb Standardmarker der Firma segenetic diente als Größenstandard. Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Kammervolumen, Applikation und Zeitplan mit einer Spannung von 60-140 V. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.10.4 Fragment-Isolierung aus Agarosegelen

Ethidiumbromid-gefärbte DNA fluoresziert im Agarosegel, wenn sie mit UV-Licht (365 nm) angeregt wird. Auf einem Transilluminator (Firma Vilber, Eberhardzell) wurden die zu reinigenden DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein ausgewogenes Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Die DNA wurde anschließend mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma QIAGEN nach Protokoll gereinigt.

2.11 Amplifikation von Nukleinsäuren

2.11.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden im Mastercycler Gradient PCR Thermal Cycler der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Bei den verwendeten Reaktionsgefäßen (PCR-Tubes) handelte es sich um dünnwandige 0,5 ml und 0,2 ml Reaktionsgefäße der Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Eppendorf (Hamburg). Die verwendeten Primer wurden bei Dr. Martin Meixner (Dienstleistungen in der Molekularbiologie und Biochemie (DLMBC), Berlin) bestellt und von den Firmen Sigma-Genosys (Steinheim) oder Operon Biotechnologies (Köln) synthetisiert.

Alle Sequenzierungen wurden von Dr. Martin Meixner (Dienstleistungen in der Molekularbiologie und Biochemie (DLMBC), Berlin) durchgeführt.

2.11.2 Amplifizierung potentieller Kandidatengene mittels degenerierter Primer

Gene, deren Mutation in *Drosophila* zu Gesangsveränderungen führen, galten als potentielle Kandidatengene. Da nur wenige Sequenzinformationen von Heuschrecken und Grillen in den Gendatenbanken vorhanden sind, musste anhand von Sequenzhomologien nahe verwandter Arten nach möglichst gut konservierten Genabschnitten gesucht werden. Anhand dieser Bereiche wurden dann degenerierte Primer konstruiert. Dabei wurden folgende Faktoren berücksichtigt:

- Maximalmischung von 64 Primern
- 3'-Ende im Bereich seltener Kodons
- Keine degenerierte Basen unter den letzten 6 am 3'-Ende
- Schmelztemperatur $T_m > 65^\circ\text{C}$
- Kein Thymin am 3'-Ende

Bei der Durchführung von PCRs mit degenerierten Primern wurde die Primerkonzentration entsprechend der Anzahl an Primern in der Mischung erhöht. Es wurden ausschließlich hot-start-PCR (s. 2.11.5) durchgeführt, um den nicht selten auftretenden starken Hintergrund zu minimieren. In einigen Fällen wurde nur ein gutes Ergebnis erreicht, wenn die hot-start Methode mit der touch-down-PCR (s. 2.11.3) kombiniert wurde. Generell wurden alle PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern mit einem Temperaturgradienten durchgeführt.

2.11.3 touch-down PCR

Das Prinzip der touch-down-PCR beruht auf einer schrittweisen Absenkung der Hybridisierungstemperatur. Dadurch soll eine höchstmögliche Spezifität der Primer erreicht und Nebenprodukte durch unspezifische Bindungen vermieden werden.

In dieser Arbeit wurde die touch-down-PCR ausschließlich unter Verwendung degenerierter Primer praktiziert (s. 2.11.2).

2.11.4 *Taq*-Polymerase vermittelte PCR

Taq DNA-Polymerase wurde ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Aufgrund der relativ hohen Fehlerrate (2×10^{-4} Fehler/Base) der *Taq*-Polymerase wurde diese ausschließlich zur Amplifikation von Fragmenten unter 1000 bp verwendet, bei denen eine hohe Genauigkeit nicht erforderlich war. Zudem besitzen mit *Taq*-Polymerase amplifizierte Fragmente einen Adenosinüberhang am 3'-Ende. Diese Eigenschaft wurde für die Klonierung in T/A-Vektoren (siehe 2.12.1) genutzt.

Die *Taq*-PCR-Ansätze enthielten Primer (15 μM /Primer), 1/10 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.55), 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Tween 20 und 20 mM MgCl_2), 1 U *Taq*-Polymerase pro 100 μl (segenetik oder Peqlab), 0,2 mM dNTPs sowie variable Mengen an Matrizen-DNA (5-500ng). Dabei ist die Menge der benötigten Matrizen-DNA von deren Qualität abhängig.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Als Reaktionsgefäße wurden ausschließlich dünnwandige 0,2 ml PCR-Tubes verwendet. Das Taq-PCR-Programm wurde wie folgt eingestellt:

15-30 x	initiale Denaturierung	95°C	1 min
	Denaturierung	95°C	0.30 min
	Hybridisierung	variabel	1 min
	Amplifikation	72°C	1 min/800 bp
	terminale Amplifikation	72°C	10 min

Die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden wurden mit der frei verfügbaren Software FastPCR (Universität Helsinki, Finnland) ermittelt. Der Primer mit der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) bestimmte die Hybridisierungstemperatur (Annealing). Die Anzahl der Zyklen war von der Menge und Qualität der Matrizen-DNA und der jeweiligen Zielsetzung abhängig.

2.11.5 Hot Start-PCR

Taq-DNA-Polymerase ist bereits bei Raumtemperatur und während der initialen Aufheizphase des Thermocyclers aktiv. Daher kann es in dieser Phase leicht zur Verlängerung von unspezifisch angelagerten Primern oder von Primer-Dimeren kommen. Dies kann zur Bildung störender Nebenprodukte beitragen oder im Extremfall zum Fehlschlagen der Reaktion führen. Durch die Hot-Start-Methode können diese unangenehmen Nebenwirkungen minimiert und somit die Spezifität der PCR erhöht werden (Chou et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde die Hot-Start-PCR durch die manuelle Zugabe der *Taq*-DNA-Polymerase nach dem ersten Aufheizen des Versuchsansatzes bewerkstelligt.

2.11.6 *Pwo*-Polymerase-vermittelte PCR

Pwo-DNA-Polymerase stammt ursprünglich aus dem hyperthermophilen Tiefseebakterium *Pyrococcus woesei*, das bei Temperaturen um 100°C optimale Wachstumsbedingungen findet.

Pwo-Polymerase verfügt über eine stark ausgeprägte 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (proofreading), die mit einer extrem niedrigen Fehlerrate einhergeht (2×10^{-5} Fehler/Base), so

dass Fragmente bis zu einer Länge von 3000 bp zuverlässig amplifiziert werden können. Die Enden der *Pwo*-PCR-Produkte sind glatt.

Die *Pwo*-PCR-Ansätze enthielten Primer (15 µM/Primer), 1/10 10 x *Pwo*-Polymerase-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.55), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20 und 20 mM MgSO₄), 2 U *Pwo*-Polymerase pro 100 µl (Peqlab), 0,2 mM dNTPs sowie variable Mengen an Matrizen-DNA (5-500ng). Die Menge der benötigten Matrizen-DNA ist von deren Qualität abhängig. Aufgrund der 3'→5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms kann es in Abwesenheit von dNTPs zu Wechselwirkungen zwischen *Pwo*-DNA-Polymerase und dem Template oder den Primern kommen, die zu einem partiellen Abbau der DNAs führen können. Daher wurden immer zwei Mastermixe auf Eis angesetzt und das Enzym mit dem Puffer erst unmittelbar vor Beginn der PCR zugegeben. Dadurch konnte die Notwendigkeit einer Hot Start PCR umgangen werden.

Ablauf der *Pwo*-Polymerase-vermittelten PCR:

	initiale Denaturierung	94°C	2 min
15-30 x	Denaturierung	94°C	0.15 min
	Hybridisierung	variabel	0.30 min
	Amplifikation	68°C	2 min/1000 bp
	terminale Amplifikation	68°C	10 min

Durch ihre höhere Amplifikationsgenauigkeit synthetisiert *Pwo*-DNA-Polymerase wesentlich langsamer als *Taq*-DNAPolymerase. Daher war es notwendig, die Elongationszeit zu verlängern.

2.11.7 RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs wurden durch das aus *Thermus thermophilus* gewonnene Enzym *Tth*-Polymerase (Peqlab) katalysiert. Um DNA-Polymerase-Aktivität zu entfalten, benötigt das Enzym unbedingt Mg²⁺-Ionen. Die Konzentration von MgCl₂ sollte dabei zwischen 0,5 - 6 mM liegen und muss für die verschiedenen Anwendungen jeweils optimiert werden.

In Gegenwart von Mn²⁺-Ionen verfügt die *Tth*-Polymerase zusätzlich über eine ausgeprägte Reverse Transkriptase-Aktivität. Die ideale Mn²⁺-Konzentration liegt bei ca. 2,5 mM.

Neben dem Vorteil einer hohen Reverse Transkriptase-Aktivität ist diese DNA-Polymerase auch äußerst hitzestabil und kann daher GC-reiche und sekundärstrukturreiche Abschnitte problemlos transkribieren.

In aller Regel wurde eine RT-PCR in zwei Schritten durchgeführt: erst wurde revers transkribiert und im Anschluss eine PCR durchgeführt.

Für die reverse Transkription wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß 20 – 200 ng mRNA oder 2 – 5 µg Gesamt – RNA mit 500 µM dNTP-Mix, 300 nM Primer, 2 mM MnCl₂, 1/10 10 x Reaktionspuffer (670 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 160 mM (NH₄)₂SO₄ und 0,1 % Tween 20) und 1 - 3 Einheiten *Tth*-DNA-Polymerase auf Eis gemischt. Anschließend wurde die Reaktion wie folgt gestartet:

Initiale Denaturierung:	70°C	5 min
Hybridisierung:	42 - 60°C	5 min
Elongation:	68 - 75°C	30 min

Nach der RT-Reaktion wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis überführt.

Für die *Tth*-PCR wurden dem Reversen Transkriptions-Ansatz 300 µM dNTP-Mix, 800 nM Primer A, 800 nM Primer B, 2,5 mM MgCl₂ sowie 1/5 5x Polymerase-Puffer (335 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 83 mM (NH₄)₂SO₄, 3,75 mM EGTA, 25 % Glycerin und 0,1 % Tween 20) zugegeben und auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt. Die PCR wurde anschließend wie folgt durchgeführt:

25-30 x	{	initiale Denaturierung	94°C	2 min
		Denaturierung	94°C	0.30 min
		Hybridisierung	variabel	0.30 min
		Amplifikation	72°C	1 min
		terminale Amplifikation	68°C	15 min

Das Ergebnis der RT-PCR wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.10.3) überprüft.

2.11.8 qRT-PCR (quantitative Reverse Transkriptase –PCR)

Die quantitative Reverse Transkriptase-PCR ist mit der Etablierung der quantitativen real time-PCR (ebenfalls als qRT-PCR bezeichnet!) aus der Mode gekommen. Im Gegensatz zur quantitativen real time PCR kann man bei der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR nur relative Quantitätsunterschiede ermitteln. Dennoch ist diese Methode eine gute Alternative für Versuche, bei denen absolute Quantitätsunterschiede nicht essentiell sind.

Zur Durchführung der qRT-PCR benötigt man einen externen sowie einen internen Standard. Der externe Standard dient einer Normierung der Proben und ermöglicht so die Vergleichbarkeit von Einzelreaktionen. In dieser Arbeit wurde ein Sequenzabschnitt des Aktins als externer Standard verwendet.

Der interne Standard sollte eine möglichst hohe Ähnlichkeit zur Testsequenz haben, aber dennoch von dieser unterscheidbar sein. In dieser Arbeit wurde daher bei allen internen Standards eine nur einmal auftretende Restriktionsstelle eliminiert. Dabei wurde die zuvor in ein Plasmid klonierte Sequenz mit einem Enzym geschnitten, das klebrige Enden erzeugt. Diese Enden wurden dann mit dem Klenow Fragment (NEB) geglättet (siehe 2.12.2) und das Plasmid wieder religiert (siehe 2.12.5).

Anschließend wurde eine *Taq*-PCR angesetzt, bei der ein Primer aus einem genspezifischen Teil und der T7-Promotor-Sequenz zusammengesetzt war und der zweite Primer ausschließlich eine genspezifische Sequenz darstellte. Im Anschluss an die PCR wurde eine *in-vitro* Transkription mittels T7-RNA-Polymerase durchgeführt (siehe 2.11.7). Danach wurde der interne Standard mit dem RNeasy Mini elute kit der Firma Qiagen gereinigt und die Konzentration des Standards gelelektrophoretisch und photometrisch bestimmt.

Die Effizienzkurve des jeweiligen Produkts wurde durch Einsetzen von 20 ng Standard-RNA in eine *Tth*-RT-PCR (siehe auch 2.11.8) ermittelt. Dabei wurden 20 Proben zuerst revers transkribiert und in der anschließenden PCR alle 2 Zyklen eine Reaktion gestoppt. Der DNA-Gehalt der Proben wurde dann photometrisch und gelelektrophoretisch bestimmt und in ein Diagramm übertragen. Dadurch war es möglich, die exponentielle Phase der Reaktion zu ermitteln und im kritischen Versuch eine entsprechende Anzahl von PCR-Zyklen mit 10 ng Standard-RNA durchzuführen. Vor der eigentlichen Reaktion wurden die Proben auf Grundlage einer RT-PCR (siehe 2.11.7) mit Aktin-Primern normiert, d.h. alle Proben wurden auf die niedrigste RNA-Ausgangskonzentration verdünnt. Dadurch wurden Unterschiede in der Effizienz der RNA-Isolierung (siehe 2.9) sowie unterschiedliche Gewebeprobenmengen ausgeglichen.

Für die kritische Reaktion wurden pro Probe 20 qRT-PCR-Reaktionen aus einem Mastermix so angesetzt, das jede Probe 10 ng Standard-RNA sowie eine unbekannte Menge (in aufsteigender Konzentration) an Ziel-mRNA enthielt. Nach Durchführung der RT-Reaktion wurde die anschließende PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase abgebrochen. 50% (i.d.R. 10 µl) des Probenvolumens wurden ü.N. mit dem Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz nur in der Probe, nicht aber im Standard vorhanden war, geschnitten. Anschließend wurde die verdaute Probe neben der unverdauten Probe auf ein Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Danach wurde die optische Dichte der unter inverser Fluoreszenz sichtbaren Banden mit dem Programm Molecular Analyst 2.11 der Firma Biorad bestimmt. Das Experiment wurde als erfolgreich eingestuft, wenn das Verhältnis von ungeschnittenem zu geschnittenem Produkt in der verdauten Probe 1:1 betrug und die Summe der optischen Dichten der drei Banden des verdauten Produkts der des unverdauten Produkts entsprachen.

2.11.9 RACE-PCR

Die RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends-PCR) ist neben dem Durchsuchen von Genbanken die am häufigsten angewandte Methode, um unbekannte Sequenzinformationen zu erhalten. Das Ziel von RACE-PCR liegt in der Isolation von unbekannten spezifischen Gen-Enden und ist eine Abwandlung der RT-PCR. In dieser Arbeit wurden zwei RACE-Strategien angewandt: zum Einen die sog. RLM-RACE (RNA ligase-mediated RACE), um unbekannte 5'-Enden zu amplifizieren, zum Anderen die sog. SMART-RACE (switching mechanism at 5' end of RNA transcript), vornehmlich zur Amplifikation von unbekannten 3'-Regionen.

Die RLM-RACE-PCR wurde mit Komponenten und in Anlehnung an das Protokoll des GeneRacer-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Bei dieser Methode werden zuerst freie 5'-OH-Enden durch das Enzym calf intestine phosphatase (CIP) degradiert. mRNA ist durch die sog. cap-Struktur am 5'-Ende vor Degradation durch CIP geschützt. Danach werden die cap-Strukturen der mRNAs mit Hilfe einer Nikotinsäure-Pyrophosphatase (TAP = tobacco acid prophosphatase) abgespalten, wobei das 5'- α -Phosphat erhalten bleibt. Mit einer T4-DNA-Ligase wurde dann ein Adapter bekannter Sequenz an das 5'- α -Phosphat ligiert. Es folgte eine Reverse Transkription (SuperScript III Reverse Transkriptase, Invitrogen) mit genspezifischem 3'-Primer und/oder einem oligo(dT)-Primer. Anschließend wurde mit dem

Reverse Transkriptase-Primer (oder einem nested-Primer) und einem verkürzten Adapter-Primer des 5'-Endes eine *Pwo*-PCR oder *Taq*-PCR durchgeführt.

Die SMART-RACE-PCR wurde mit Komponenten der Firma Clontech in Anlehnung an das Protokoll für die cDNA-Bibliothek (siehe sscDNA-Synthese und cDNA-Anreicherung mittels PCR) durchgeführt. Die gesamte mRNA wurde ausgehend von einem geankerten oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit dem Reverse Transkriptase-Primer (oder einem nested-Primer) und einem genspezifischen 5'-Primer eine *Pwo*-PCR oder *Taq*-PCR durchgeführt.

Alle Produkte aus den RACE-PCRs wurden durch Gelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls kloniert und sequenziert.

2.12 Klonierung

2.12.1 Herstellung von Vektoren zur direkten Klonierung von PCR-Produkten

DNA-Fragmente, die mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, besitzen i.a.R. einen einzelnen Adenin-Überhang an den 3'-Enden. Um diese Fragmente effizient zu klonieren, wurden Vektoren mit komplementären Überhängen (sogenannte T/A-Vektoren) hergestellt. Dazu wurden 2 µg Vektor-DNA mit einem Restriktionsenzym, das glatte Enden erzeugt, ü.N. verdaut (in der Regel wurde der Vector pDrive (Qiagen, Hilden) und die Restriktionsendonuklease EcoRV (NEB, Ipswich, UK) verwendet).

Der geschnittene Vektor wurde anschließend mit 20 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol Thymin in Polymerase Puffer (Qiagen, Hilden oder segenetic, Borken) für 2h bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine Säule (segenetic, Borken) von Polymerase und überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Das so behandelte Plasmid kann aufgrund seiner Thymin-Überhänge zur direkten Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt werden, die mittels *Taq*-Polymerase erzeugt wurden.

2.12.2 Glätten überhängender Einzelstrangbereiche

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (NEB, Ipswich, UK) aufgefüllt. Zusätzlich zur 5' → 3'-Polymeraseaktivität besitzt dieses Enzym auch 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, daher wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Pro 1 µg DNA wurde 1 U Klenow-Enzym mit 100 µmol dNTP in

entsprechendem Reaktionspuffer 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine Säule (segenetik, Borken) gereinigt.

2.12.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (NEB) dephosphoryliert, um spätere Religation zu vermeiden. Dazu wurden 10 µl 10 x Phosphatase-puffer (500 mM Tris/HCl pH 8,5; 1 mM EDTA), 2 U alkalische Phosphatase (NEB, Ipswich, UK) und ca. 2 µg der Vektor-DNA mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl EDTA (0,2 M) und Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert, oder über eine Säule (segenetic, Borken) gereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der geschnittenen dephosphorylierten Vektor-DNA in einer Gelelektrophorese bestimmt.

2.12.4 Restriktion von Vektoren

In der Regel wurde ca. 1 µg DNA mit 1-10 U Restriktionsenzym 30 min ü.N. nach Herstellerangaben (Puffer, Temperatur) inkubiert. Restriktionsansätze, die Plasmid-DNA aus Minipräparationen enthielten, wurden zusätzlich mit RNase A (Sigma-Aldrich, München) versetzt.

2.12.5 Ligation

DNA-Fragmente wurden in 1-3-fach molarem Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt. Alle Reaktionsansätze zur Klonierung von DNA wurden mit T4 DNA-Ligase (1 U) in 1 x Ligase-Puffer (60 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTE und 1 mM ATP) durchgeführt. Die Inkubationsdauer war abhängig von der „Klebrigkeit“ (stickyness) der DNA-Enden. DNA-Fragmente mit glatten Enden wurden ü.N. bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Mit *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte wurden für 4h bei RT inkubiert. DNA-Fragmente mit mehreren überhängenden Nukleotiden wurden für 2h bei RT inkubiert.

2.12.6 Transformation

Pro Transformationsansatz wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz, bei Retransformationen nur ca. 100 ng Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und anschließend für 30 min. auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde bei 42°C für 100 s durchgeführt. Damit sich die Zellmembran erholen und das Plasmid die Translation des Resistenzgens starten konnte, wurden die Zellen 1h bei 37°C in 1ml Kulturmedium inkubiert. Zur anschließenden Selektion auf Plasmidaufnahme wurden die Bakterien auf einer LB-Antibiotika-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.12.7 α -Komplementation

Plasmide, die das *lacZ*-Gen tragen, kodieren für das α -Peptid der β -Galaktosidase. IPTG induziert die Bildung der β -Galaktosidase durch Entfernung des *lac*-Repressor-Proteins. β -Galaktosidase spaltet X-Gal und führt dadurch zu einer Blaufärbung der Kolonien. Wird DNA in die kodierende Region des α -Peptids kloniert, geht die Fähigkeit zur α -Komplementation verloren. Folglich können die Bakterien keine enzymatisch aktive β -Galaktosidase mehr bilden. Kolonien mit rekombinanten Plasmiden erscheinen folglich weiß. Zur Identifizierung rekombinanter Plasmide wurde dem Agar daher IPTG und X-Gal zugesetzt (siehe 2.2).

2.13 cDNA-Bibliothek

Alle gängigen Verfahren zur Herstellung von cDNA beruhen auf reverser Transkription (RT), wobei mRNA in einzelsträngige DNA (= ssDNA, single stranded DNA) umgeschrieben wird. Selbst bei großen Mengen mRNA bleibt die reverse Transkription ein kritischer Schritt, da sich Reverse Transkriptasen häufig früher als erhofft von der mRNA lösen und somit unvollständige ssDNA generieren. Dies trifft vor allem für besonders lange mRNAs zu, wenn ausschließlich mit oligo(dT)-Primern gearbeitet wird, oder die mRNA besonders viele sekundäre Strukturen aufweist. Eine weitere Schwachstelle vieler gängiger Verfahren ist die Verwendung von T4 DNA-Polymerase zur Generierung glatter Enden bei der Doppelstrangsynthese. Die Verwendung von T4 DNA-Polymerase führt dazu, dass 5'-Enden

der Gene in der cDNA 5-30 Nukleotide kürzer sind als die entsprechende mRNA (Keohavong et al. 1988).

Daher wurde in dieser Arbeit die PowerScript Reverse Transkriptase der Firma Clontech verwendet. Diese Reverse Transkriptase zeichnet sich durch besondere Stabilität und Zuverlässigkeit beim Transkribieren von langen und sekundärstruktureichen mRNAs aus. Zusätzlich generiert diese Transkriptase einen Überhang von drei Cytosinnukleotiden am 3'-Ende der ssDNA, der als Adapter genutzt werden kann.

2.13.1 sscDNA-Synthese (Erststrang cDNA-Synthese)

In einem sterilen 0,2 ml Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis wurden 3 µl der gereinigten mRNA (~ 0,05 µg mRNA), ein geankerter Oligo(dT)-Primer mit Sfi I-Schnittstelle (siehe 5.1) und ein Adapterprimer mit drei Guaninnukleotiden am 3'-Ende und Sfi I-Schnittstelle (siehe 5.1) gemischt. Um die mRNA zu denaturieren, wurde die Probe für 4 min auf 72°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach zwei Minuten Inkubation auf Eis wurden der Probe 20mM DTT, 10mM dNTPs, 5 x Reaktionspuffer (Clontech) sowie 1 µl PowerScript Reverse Transkriptase (Clontech) zugesetzt. Die Probe wurde gemischt und für 80 min bei 42°C inkubiert (PCR Thermal Cycler, Eppendorf). Die ssDNA wurde sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.13.2 cDNA Anreicherung mittels PCR

Um die entstandene ssDNA zu stabilisieren und zu amplifizieren, wurde in direktem Anschluss an die Erststrangsynthese eine PCR durchgeführt. Um besonders lange Fragmente effizient zu amplifizieren, wurde ein Long PCR Enzyme Mix der Firma Fermentas verwendet. Es wurden jeweils 2 µl der Erststrangsynthesereaktion in ein 0,5ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und alle weiteren Komponenten nach Herstellerangaben (Fermentas) zugesetzt. Als Primer wurden verkürzte Formen des Oligo(dT)-Primers und des Adapterprimers aus der Erststrangsynthese verwendet.

Die PCR wurde anschließend nach folgendem Schema durchgeführt:

	Denaturierung	94°C	1 min
10 x	Denaturierung	94°C	0.20 min
	Annealing	64°C	0.30 min
	Amplifikation	68°C	10 min
14 x	Denaturierung	94°C	0.20 min
	Annealing	64°C	0.30 min
	Amplifikation	72°C	10 min + 0.10 je Zyklus

2.13.3 Reinigung und Restriktion der cDNA

Die amplifizierte cDNA wurde im Anschluss an die PCR mit 2µl Proteinase K versetzt und 20 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.10.1) gereinigt und die cDNA mit 10µl 3 M Natriumacetat und 1,3µl Glycogen (20 µg/µl) in 95%igem EtOH gefällt, usw. (siehe 2.10.2). Das Pellet wurde in 79µl H₂O aufgenommen und mit 10µl Sfi I Puffer, 10µl Sfi I und 1µl BSA für 2h bei 50°C verdaut.

2.13.4 Größenfraktionierung der cDNA

Bei kleinen Fragmenten (< 400 bp) in der gereinigten und verdauten cDNA handelt es sich in aller Regel um Bruchstücke, Primer und Restriktionsreste. Diese Fragmente können die Effizienz der Klonierung senken und damit die Qualität einer cDNA-Bibliothek mindern. Daher wurde die cDNA vor der Klonierung größenfraktioniert. Hierzu wurden Chroma Spin-400 Säulen der Firma Clontech verwendet. Der cDNA wurden 2µl 1% Xylene-Cyanol-Farbstoff als Marker zugesetzt und die Größenfraktionierung nach Herstellerprotokoll (Clontech) durchgeführt. Anschließend wurden die fraktionierten Proben in einer Gelelektrophorese (siehe 2.10.3) auf deren DNA-Gehalt hin überprüft, die gewünschten Fraktionen präzipitiert (siehe 2.10.2) und die cDNA in 7µl H₂O aufgenommen.

2.13.5 Ligation der cDNA in den Vektor pDNR-LIB

Die doppelsträngige cDNA wurde nach dem Sfi I-Verdau und der Größenfraktionierung in den Sfi I-geschnittenen und dephosphorylierten pDNR-LIB-Vektor kloniert. Dazu wurden 2,5µl cDNA, 0,2µg pDNR-LIB, 10mM ATP, 0,5µl 10x Ligations Puffer (NEB) und 1µl T4-DNA-Ligase gemischt und ü.N. bei 16°C inkubiert.

2.13.6 Transformation des Ligationsprodukts

Ein entscheidender Schritt bei der Herstellung einer cDNA-Bibliothek ist die Transformation des cDNA enthaltenden Vektors in Bakterien. Da nur extrem hohe Transformationsraten ($>10^9$ Transformante Zellen/µg Vektor) eine gute Repräsentation aller Gene in der späteren Genbank ermöglichen, kommen keine Zellen aus Eigenherstellung in Frage. Daher wurde der ligierte Vektor in elektrokompente EZ10 Zellen der Firma Clontech transformiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Elektroporator (Genepulser, Firma Biorad, München) bei 1,75 kV, 25µF und 200 Ω in einer 0,1 cm Einmalküvette, ansonsten wurde nach Herstellerangaben der Firma Clontech gearbeitet.

2.13.7 Titerbestimmung der Plasmidbibliothek

Die Titerbestimmung ist erforderlich, um die Effizienz der Transformation und damit auch die Qualität der cDNA-Bibliothek einschätzen zu können. Zudem benötigt man für die anschließende Amplifikation der Genbank die Dichte der koloniebildenden Zellen (cfu = colony forming unit), um die Anzahl der benötigten Agarplatten zu ermitteln.

Der cDNA-Bibliothek wurde 1µl entnommen und in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 1ml LB-Medium gemischt. Aus dieser Mischung wurde wiederum 1µl entnommen und mit 1ml LB gemischt. Die daraus resultierenden Verdünnungen waren 1:10³ bzw. 1:10⁶. Anschließend wurden 1µl der 1:10³-Mischung sowie 50µl und 100µl der 1:10⁶-Mischung auf LB/Cm-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Um die Dichte der koloniebildenden Zellen pro ml (cfu/ml) zu bestimmen, wurden die Kolonien gezählt und mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert. Generell sollte eine Plasmid-Genbank dabei einen Titer von 10⁸ cfu/ml nicht unterschreiten.

2.13.8 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Um ausreichend Material für weitere Untersuchungen zu erhalten, muss die Original-Genbank amplifiziert werden.

Dazu wurde die Original-Genbank verdünnt und in einer Dichte von ca. 30.000 cfu pro 150mm Agarplatte direkt auf LB/Cm Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert und die Kolonien anschließend mit jeweils 5ml LB + 25% Glycerin abgewaschen. Die cDNA-Plasmid-Genbank wurde anschließend in 50ml-Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.13.9 Kolonie-Transfer

Beim Kolonie-Transfer werden die rekombinanten Bakterien aus der cDNA-Bibliothek auf Filter übertragen. Die Genbank wurde dazu auf Cm/Agarplatten eines Durchmessers von 14 cm (Falcon) so ausplattiert, dass einzelne Klone sich i.d.R. gerade nicht berührten. Dabei wurden die Platten bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien auf einen Durchmesser von ~ 0,3 mm gewachsen waren. Dann wurden die Platten für 30 min bei 4°C inkubiert. Nylon-Membranen (Biobond, Sigma-Aldrich, München) mit einem Durchmesser von 13,7 cm wurden anschließend 1 min luftblasenfrei auf die mit Kolonien bewachsenen Platte gelegt. Mit einer heißen Injektionsnadel wurden die Filter asymmetrisch an drei Stellen durchstoßen und die Einstichpunkte auf der Unterseite der Platte mit einem wasserfesten Filzschreiber markiert. Die Membran wurde vorsichtig von der Platte abgenommen und mit der Kolonieseite nach oben für 5 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Zur Neutralisierung wurde die Membran anschließend zweimal auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Filterpapier gelegt und jeweils 5 min inkubiert. Die Membranen wurden danach 15 min bei RT zwischen jeweils zwei Filterpapieren getrocknet und die DNA durch 30-minütiges Inkubieren bei 80°C permanent an die Membrane gebunden. Bis zur Hybridisierung wurden die Membranen bei 4°C zwischen Filterpapieren aufbewahrt.

Denaturierungs-Lösung:

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungs-Lösung:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl pH 7.4

Unmittelbar vor der Hybridisierung wurden die Membranen ü.N. bei 37°C in einem Proteinase-K-Puffer (100 µg Proteinase K; 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1% SDS; 50 mM NaCl inkubiert. Danach wurden die Membranen mit 2 x SSC für 5 min gewaschen und direkt im Hybridisierungsschritt weiterverwendet.

2.13.10 Markierung von Nukleinsäuren

Die Herstellung ³²P-dCTP-markierter DNA-Sonden für die Hybridisierungen erfolgte nach der "random priming"-Methode von Feinberg & Vogelstein (1983). Dazu wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß 100ng denaturierte DNA, 2 µl 10 x Hexanukleotidmix (Boehringer), je 1 mM dATP, dGTP und dTTP, 3U Klenow-Fragment und ca. 10 µCi/µl ³²P-dCTP zusammengegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 100 µl EDTA gestoppt.

Die markierte DNA-Sonde wurden durch Gelfiltration (Sephadex G50; Pharmacia) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die Effizienz der Markierung wurde grob mit einem Geigerzähler (Gamma-Scout, Firma Gamma-Scout, Schiersheim) bestimmt.

Markierte Proben wurden immer „frisch“ während der Prähybridisierung hergestellt und direkt verwendet.

2.13.11 Hybridisierung

Als Hybridisierungsprobe wurde radioaktiv markierte DNA verwendet. Die Länge der Hybridisierungsproben lag zwischen 100 und 600 bp. Die Hybridisierung erfolgt in drei Schritten, der Prähybridisierung, der Hybridisierung und dem Waschen der Filter.

2.13.11.1 Prähybridisierung

Die feuchten Nylonmembranen wurden mit der DNA-haltigen Seite nach innen über eine Plastikpipette eingerollt und dann luftblasenfrei an der Innenwand eines Glas-Hybridisierungszylinders ausgerollt. In den Hybridisierungszylinder wurden 50 ml der Hybridisierungslösung gegeben und die Membranen für 2-4 h bei 65°C in einem Rollerbrutschrank (Biometra, Göttingen) inkubiert. Durch die im Hybridisierungspuffer enthaltene denaturierte und sonifizierte Lachssperma-DNA wurden freie Bindungsstellen auf

den Membranen abgesättigt. Dadurch sollen unspezifische Bindungen der markierten Sonden-DNA verhindert und so die Hintergrundstrahlung minimiert werden.

2.13.11.2 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung sollen sich die markierten DNA-Fragmente an die homologen Sequenzen der einzelsträngigen DNA auf der Nylonmembran anlagern. Durch die Wahl der Hybridisierungsbedingungen (Salzkonzentration, Temperatur) lässt sich die Spezifität der Bindung regulieren.

Die markierte Proben-DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß 10 min bei 95°C inkubiert. Die denaturierte Probe wurde 5 min im Eisbad abgekühlt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Die markierte Proben-DNA wurde danach im vorgewärmten Hybridisierungspuffer aufgenommen und der Prähybridisierungspuffer in den Hybridisierungszylindern durch den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Zylinder wurden anschließend ü.N. bei 55°C in einem Rollerbrutschrank (Biometra, Göttingen) inkubiert.

2.13.11.3 Waschen der Membranen

Ungebundene markierte DNA-Fragmente wurden durch mehrmaliges Waschen in unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen entfernt. Bei radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde bei jedem Pufferwechsel die noch auf den Membranen befindliche Radioaktivität bestimmt, um ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis zu erzielen.

Zweimal in Folge wurden die Filter mit jeweils 100 ml Waschpuffer I bei RT für 5 min auf einem Schüttler (Memmert, Schwabach) bei geringer Bewegungsintensität inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrmals (mindestens zweimal) mit jeweils 100 ml vorgewärmtem Waschpuffer II bei 55°-65°C für 30 min in einem Wasserbadschüttler inkubiert.

Die Membranen wurden anschließend in Frischhaltefolie eingewickelt, mit einer Belichtungsmarkierung versehen und auf einem Autoradiographiefilm X-OMAT AR (Kodak) bei -20°C für 1-5 Tage exponiert.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Lösungen für die Durchsuchung der Genbank.

	Prähybridisierungs- Lsg.	Hybridisierungs- Lsg.	Wasch-Lsg. I	Wasch-Lsg. II
SSC^{*1}	5x	5x	2x	0,1x
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1%	0,1%
LS-DNA (Lachssperma)	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	-	-
Denhardts^{*2}	5x	5x	-	-
³²P-dCTP- DNA-Sonde	-	+ ^{*3}	-	-

^{*1} 20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

^{*2} 100 x Denhardts: 2 g/l BSA (Rinderserumalbumin); Ficoll 400; Polyvinylpyrrolidon

^{*3} Einsatz pro ml Hybridisierungslösung: 10⁶ cpm

2.13.12 Isolierung positiver Klone

Nach der Autoradiographie wurden die Röntgenfilme anhand der Einstichmarkierungen den entsprechenden Membranen und damit auch den Agarplatten zugeordnet.

Positive Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gesammelt und auf ihre Insertionen hin untersucht (Mini-Präparation, Restriktion). Wurde eine große Anzahl positiver Kolonien detektiert, wurden diejenigen mit den häufigsten Insertionen ansequenziert. War die Anzahl unterschiedlicher Insertionen größer als 20, wurden die positiven Kolonien einzeln auf eine Agarplatte geimpft und anschließend eine weitere Kolonie-Hybridisierung (unter stringenteren Bedingungen) durchgeführt.

2.14 *in-situ* Hybridisierung

2.14.1 Herstellung von Gefrierschnitten aus neuronalem Gewebe

Zur Präparation der thorakalen und abdominalen Ganglien wurden die Grillen dorsal mit Bienenwachs auf einer Präparierhalterung fixiert. Die Grillen wurden von ventral beidseitig der Mittelachse aufgeschnitten und das Strickleiternnervensystem vom 7. und 8. Abdominalganglion bis zum 1. Thorakalganglion (Prothorakalganglion) herauspräpariert. Zur Präparation des Oberschlundganglions (Gehirns) wurde den Grillen der Kopf mit einem Skalpell unmittelbar vor dem Thorax abgetrennt und an einer Präparierhalterung fixiert.

Beginnend mit den optischen Loben wurde in Folgenden die Kopfkapsel geöffnet und das Gehirn herauspräpariert.

Das neuronale Gewebe wurde sofort in 4%-igem Paraformaldehyd in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄) bei 4°C für 2 h fixiert. Anschließend wurden die Ganglien 4 Mal für 15 min in 4°C kaltem PBS-Puffer gewaschen und in 30% Saccharose in PBS-Puffer bei 4°C ü.N. inkubiert.

Unmittelbar vor dem Anfertigen der Gefrierschnitte wurde das Gewebe aus dem Saccharose-PBS-Puffer entnommen, vorsichtig mit einem Fasertuch vom Puffer befreit und bei 4°C für 20 min in Gefriermedium (Tissue-Tec OCT, Firma Sakura Finetek, Japan) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe auf einem Metallblock ausgerichtet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Kryostat weiterverarbeitet. Um das Gewebe herum wurde eine entsprechende Metallform gelegt, deren Aussparung mit Gefriermedium gefüllt wurde. Der so entstandene Block wurde auf einer Trägerplatte fixiert und in die Schnittparatur eingespannt.

Das Kryotom wurde auf eine Schnittdicke von 8 µm eingestellt und die Klinge manuell durch das Präparat bewegt. Die so entstandenen Schnitte wurden vorsichtig auf einen silanisierten, 4°C warmen Objektträger (HistoBond, Firma Marienfeld, Lauda-Königshofen) überführt. Die Qualität der Schnitte wurde unter einem Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) bei 100-facher Vergrößerung kontrolliert.

Die fertigen Präparate wurden für 5 min luftgetrocknet und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend in einer Alkoholreihe (20-100%) dehydriert. Bis zur Hybridisierung wurden die Schnitte bei 4°C in 100 %-igem Ethanol aufbewahrt.

2.14.2 Nachweis von spezifischen Transkripten durch Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

Die Markierung von sense- und antisense-Sonden erfolgte unter Verwendung des DIG- Labelling-Kits der Firma Roche Applied Science nach Herstellerangaben. Mit den Enzymen T7- bzw. SP6-RNA Polymerase wurde die DNA in einzelsträngige DIG-markierte RNA umgeschrieben.

2.14.3 Hybridisierung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Vor der Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte luftgetrocknet, 5 min in 2 x SSC rehydriert und 20 min bei 70°C in 2 x SCC inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeproben kurz in H₂O gespült, 2 min in Proteinase K (4 µg/ml in H₂O) und 2 min in 0,2% Glycin in PBS bei RT inkubiert. Darauf folgte eine erneute Fixierung und Dehydrierung (s.o.).

In einer durch Equilibrierungslösung (siehe Tab. 4) feuchtgehaltenen Kammer wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit jeweils 100 µl Hybridisierungslösung (siehe Tab. 4) betropft, mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt und bei 42°C ü.N. inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal mit Waschlösung (siehe Tab. 4) für jeweils 1, 2 und schließlich 3 h bei 37°C gewaschen.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösungen für die in-situ Hybridisierung

	Equilibrierungs-Lsg.	Hybridisierungs-Lsg.	Wasch-Lsg.
Formamid	50%	50%	50%
SSC* ¹	5 x	5 x	2 x
LS-DNA (Lachssperma)	-	0,1 mg/ml	-
Heparin	-	50 µg/ml	-
Tween 20	-	0,1%	-
DIG-markierte RNA-Sonde	-	0,5 µg/ml	-

*¹ 20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

2.14.4 Nachweis hybridisierter Digoxigenin-Sonden

Der Nachweis hybridisierter Sonden wurde nach Herstellerprotokoll mit dem „DIG-labelling and detection kit“ der Firma Roche durchgeführt. Es wurde ein anti-Digoxigenin-Antikörper verwendet, an den alkalische Phosphatase gebunden war. Die alkalische Phosphatase wurde mit Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (NBT/BCIP; Roche) nachgewiesen. Durch Inkubation der Präparate auf einem Schüttler (bei minimaler Bewegung) in 95 % Ethanol bei RT konnten die Präparate von unspezifischen Bindungen befreit werden.

Fertige Präparate wurden zur Dokumentation mit 50% Glycerin/Gelatine (Sigma-Aldrich, München) eingedeckt und nach mikroskopischer Auswertung bei 4°C gelagert.

2.15 NONA Antikörper

2.15.1 Expression des *nonA* Fragments im Vektor pMAL-c2X

Um ein geeignetes *nonA*-Fragment für die spätere Immunisierung zu finden, wurde die CDS (coding sequence = kodierender Sequenzbereich) einer Hydropathizitäts-Analyse nach Kyte & Doolittle (Kyte J., Doolittle R.F., 1982) unterzogen (ExPASy (Expert Protein Analysis System), Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), <http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>). Anhand der analysierten Sequenz wurden Fragmente mit besonders guten Antigen-Eigenschaften identifiziert. Anschließend wurde das Fragment durch *PWO*-vermittelte PCR amplifiziert. Der 5'-Primer begann dabei mit dem ersten Codon des zu klonierenden Fragments, wohingegen der 3'-Primer um ein Stop-Codon und eine Hind III-Schnittstelle erweitert wurde. Somit erhielt man ein Fragment, das nach Restriktionsverdau ein glattes 3'-Ende und ein klebriges Hind III-5'-Ende besaß. Dieses Fragment konnte nun gerichtet in die Xmn I- Schnittstelle (glatt) und die Hind III-Schnittstelle (klebrig) des pMAL-c2X-Vektors geklont werden. Anschließend wurde das Plasmid in kompetente BL21-Zellen transformiert und die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicilin ausgestrichen. Um effizient positive Klone (mit *nonA*-Fragment) von negativen Klonen unterscheiden zu können, wurden nach ü.N.-Inkubation einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze jeweils auf eine neue LB-amp+-Platte bzw. auf eine LB-amp+-Platte mit 80µg/ml X-Gal und 0,1 mM IPTG transferiert. Nach erneuter Inkubation von ca. 4h konnten positive Klone (keine α -Komplementation, s. 2.12.7) durch Abgleichen der beiden Platten ermittelt werden. Durch Sequenzierung wurde anschließend kontrolliert, ob sich das Fragment in einem Leserahmen befand.

2.15.2 Expression des NONA-Fusionsproteins

1l Rich-Medium mit Glukose und Ampicilin wurde mit 10ml einer Übernachtskultur der BL-21 Bakterien mit dem das *nonA*-Fragment-enthaltenden pMAL-c2X-Vektor angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von ca. 2×10^8 Zellen/ml ($A_{600} \sim 0,5$) auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 72 mg IPTG induziert und bei 30°C für weitere 4h inkubiert.

2.15.3 Reinigung des Fusionsproteins

Nach Erreichen der optimalen Dichte wurden die Zellen bei 4000 x g für 20 min auf 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Säulenpuffer (20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM β -Mercaptoethanol, 1mM Natriumazid) resuspendiert und ü.N. bei -20°C tiefgefroren. Um die Zellwände vollständig zu zerstören, wurden die Bakterien in Eiswasser aufgetaut und mit Ultraschall-Pulsen von 15 sek. Länge sonifiziert (Sonoplus, Bandelin). Die Proteinfreisetzung wurde kontinuierlich mittels Bradford-Assay (siehe 2.15.4) bestimmt und die Sonifikation solange fortgesetzt, bis die freigesetzte Proteinmenge konstant blieb. Anschließend wurde die sonifizierte Lösung bei 9000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und mit Säulenpuffer im Verhältnis 1:3 verdünnt.

Die eigentliche Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über eine Amylosesäule (New England Biolabs) nach Herstellerangaben. Das mit 50 ml maltosehaltigem Säulenpuffer (s.o. + 10mM Maltose) eluierte Fusionsprotein wurde in 3ml-Fractionen gesammelt und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Die proteinenthaltenden Fractionen wurden für weitere Anwendungen bei -70°C gelagert.

2.15.4 Bradford-Assay

Das Bradford-Assay (nach Bradford 1976, leicht modifiziert) ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösungen. Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (PepLab) an Proteine in saurer Lösung. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm.

Anhand von Eichkurven lassen sich auf diese Weise Proteinkonzentrationen von wenigen $\mu\text{g/ml}$ bestimmen.

Für die Testung der Lösungen wurden 96er-Mikrotiterplatten verwendet (s. Abb. 7). Mit einem ELISA-Messgerät wurde die Absorption ermittelt und anhand einer BSA-Eichkurve die Ausgangskonzentration der zu bestimmenden Proben ermittelt.

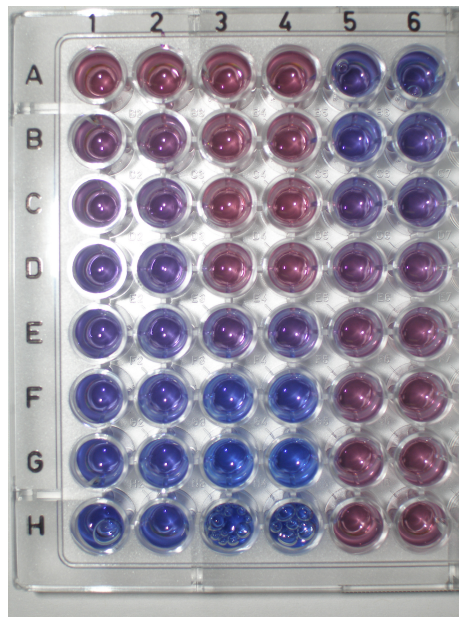


Abbildung 7: Bradford-Assay (Testreihe in Mikrotiter-platte).

1A-1H und 2A-2H BSA-Testreihen für Eichkurve; Testreihen 3A-3H+5A-5H und 4A-4H+6A-6H.

Bradford Reagenz:

100 mg Coomassie-Brilliant-Blue G250

50 ml 95% EtOH

100 ml 80% o-Phosphorsäure

Den Farbstoff lösen und mit sterilem H₂O auf 1 l auffüllen, anschließend lichtgeschützt bei 4°C lagern.

2.15.5 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um die spezifischen Antikörper aus dem Serum zu isolieren, wurde das gereinigte NONA-Protein in einer Konzentration von 0,1 mg/cm² auf eine trockene Nitrocellulosemembran gegeben. Schwach gebundene Proteine wurden durch 5-minütige Inkubation der Membran in 100 mM Glycin/HCl-Lösung pH 2,5 abgewaschen. Danach wurde zweimal 2 min in TBS gewaschen. Die Membran wurde anschließend 1 h bei RT mit 3 % BSA in TBS auf einem Schüttler geblockt und wiederum zweimal 2 min in TBS gewaschen.

Durch Inkubation der Membran in 1:10 Serum:TBS-Lösung (ü.N. bei 4°C auf einem Schüttler), wurden die Antikörper an die auf der Membran gebundenen Proteine gekoppelt. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄) gewaschen.

Um die Antikörper von der Membran zu lösen, wurde diese in ca. 0,5 x 1 cm kleine Streifen zerschnitten, die einzeln in Eppendorfreaktionsgefäßen mit jeweils 1 ml Glycin 10 min unter gelegentlichem Vortexen inkubiert wurden. Anschließend wurde das die Antikörper enthaltende Glycin mit 1 M Tris pH 8 auf eine pH von 7,0 gebracht (ca. 100 µl 1 M Tris auf 1 ml Glycin). Zur Stabilisierung wurden der Lösung 5 mM Natriumacetat und 1 mg/ml BSA zugesetzt. Die gereinigte Antikörper-Lösung wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

Die Spezifität des Antikörpers wurde auf einer Nitrocellulosemembran gegen Kaninchen, *Drosophila melanogaster* und *Gryllus bimaculatus* getestet. Ein Signal wurde ausschliesslich bei *Gryllus bimaculatus* erhalten, im Western-Blot waren keine Nebenbanden erkennbar.

2.15.6 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung

Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Wyckoff (1976) in einer Elektrophoresekammer der Firma Pharmacia aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein 2-212 kDa Protein-Marker der Firma New England Biolabs. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 10%igem Trenngel, das mit einem 5%igem Sammelgel überschichtet wurde. Um die Proteine nach der Trennung sichtbar zu machen, wurde das Gel für 1h in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend nach Bedarf in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

SDS-PAGE-Laufpuffer:	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer:	2 ml 20% SDS; 2ml 87% Glycerin; 1 ml Mercaptoethanol; 1, 25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8; 60 µl 1% Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung:	0, 25% Coomassie Brilliant Blue; 50% Methanol; 10% Essigsäure in Wasser
Coomassie-Entfärbelösung:	30% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser

2.15.7 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem „semi-dry“ Blotter (TE70X) der Firma Hoefer auf eine Nitrocellulosemembran (Sigma) geblottet. Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 90 min bei 40 Milliampere. Der Blotting-Puffer beinhaltete 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS und 20 % Methanol.

2.15.8 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte in vier Schritten, die jeweils von mehreren Waschschritten unterbrochen waren:

Tabelle 5: Inkubationsbedingungen beim Nachweis immobilisierter Proteine

	Inkubationsbedingungen	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT)	Blockierungslösung * ¹
Waschen	3 x 15 min (RT)	Waschlösung I * ²
Inkubation mit primären Antikörper	ü.N. (4°C)	1. Antikörper-Inkubationslsg. * ³
Waschen	3 x 15 min (RT)	Waschlösung I * ²
Inkubation im sekundären Antikörper	100 min (RT)	2. Antikörper-Inkubationslsg. * ⁴
Waschen	3 x 15 min (RT)	Waschlösung I * ²
Waschen	15 min (RT)	Waschlösung II * ⁵
Färbereaktion	max. 20 min	NBT / BCIP * ⁶
Stopreaktion	kurz	H ₂ O

*¹ Blockierungslösung (1 % BSA in 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄))

*² PBT (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; 0.3-0.5 % v/v Triton X-100)

*³ primärer Antikörper in PBT

*⁴ sekundärer Antikörper in PBT

*⁵ NBT (10 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 10mM MgCl₂)

Zuerst wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Nitrocellulose-Membran blockiert. Im zweiten Schritt wurde die Membran im primären Antikörper inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation im sekundären, an alkalische Phosphatase gebundenen Antikörper. Die abschließende Färbereaktion (4. Schritt) erfolgte mit NBT/BCIP. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten auf einem Schüttler bei geringer Intensität.

2.16 RNA-Interferenz

2.16.1 Herstellung von dsRNA

Die Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten dsRNAs erfolgte mit dem MEGAscript RNAi Kit der Firma Ambion. Die gewünschten Fragmente der Zielgene wurden durch *Pwo*-vermittelte PCR amplifiziert, wobei die gewählten Primer aus zwei Bereichen bestanden: einem genspezifischen Abschnitt von 15-17 bp Länge am 3'-Ende und einem T7 Promotor am 5'-Ende des Primers. Durch die PCR wurde das gewünschte Fragment amplifiziert und

gleichzeitig um die T7-Promotorsequenz erweitert. Das entstandene PCR-Produkt wurde durch eine Säule der Firma segenetic von Primern, Polymerase, dNTPs und Puffer nach Herstellerangaben gereinigt. Um mögliche RNase-Kontaminationen endgültig aus dem gereinigten Produkt zu entfernen, wurde anschließend eine Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 2.10.1) durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.10.2) und in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde der DNA-Lösung 1 µl entnommen, um die Konzentration der DNA durch Gelelektrophorese zu bestimmen.

In 20 µl des Transkriptionsansatzes wurden 2 µg DNA mit 2 µl 10 x T7-Reaktionspuffer, je 7,5 mM ATP, CTP, GTP und UTP, sowie 2 µl eines T7-Enzym-Mixes zusammengegeben und gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 2-6 h bei 37°C inkubiert. Die optimale Inkubationszeit variiert je nach Länge der Matrizen-DNA und Effizienz der Transkription und wurde durch stündliche photometrische Messungen bei 260 nm bestimmt. Transkripte, die größer als 700 nt waren, wurden 5 min bei 75°C denaturiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Um Matrizen-DNA und ssRNA aus der Reaktion zu entfernen, wurde ein Verdau mit DNase I und RNase durchgeführt und die verbleibende dsRNA über eine Säule gereinigt (alles MEGAscript RNAi Kit, Ambion). Die Eluierung der dsRNAs erfolgte jeweils direkt mit dem verwendeten Injektionspuffer.

Anschließend wurde die Qualität der gereinigten dsRNAs durch Gelelektrophorese von 1/200 der dsRNA kontrolliert. Die beiden dsRNAs wurden kurz vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt und direkt über die Injektionskapillare aufgenommen.

2.16.2 Injektion von dsRNA in Grillen

Um in Grillen Gene in vivo herunter zu regulieren, wurden in Vorversuchen vier Strategien getestet:

- Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion adulter männlicher Grillen
- Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion subadulter Männchen
- Injektion von dsRNA ins Abdomen adulter männlicher Grillen
- Injektion von dsRNA ins Abdomen subadulter männlicher Grillen

In jedem der Vorversuche dienten vier Gruppen von Grillen als Kontrolle:

- Tiere, denen *eGFP* (enhanced Green Fluorescence Protein)-dsRNA im Injektionspuffer injiziert wurde
- Tiere denen Injektionspuffer injiziert wurde
- Tiere, deren Handling dem behandelten Tiere entsprach (d.h. Betäubung, Fixierung etc.)
- unbehandelte Tiere

Nach Verfeinerung der Methode und einer deutlichen Erhöhung der Überlebensrate der Tiere in den Vorversuchen konnte die Anzahl der Behandlungsarme auf folgende reduziert werden:

- Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion adulter männlicher Grillen
- Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion subadulter Männchen

Als Kontrolle dienten:

- Tiere denen *eGFP*-dsRNA im Injektionspuffer injiziert wurde
- unbehandelte Tiere.

2.16.2.1 Injektion von dsRNA ins Metathorakalganglion adulter und subadulter männlicher Grillen

Um mögliche Barrieren vor der Zellmembran der Nervenzellen zu umgehen, wurde die dsRNA durch eine Mikrokapillare direkt ins Metathorakalganglion der Grillen injiziert. Die Grillen wurden dazu dorsal mit Knetmasse in einer tiefen Petrischale fixiert und anschließend mit CO₂ betäubt. Damit die Tiere während der Injektion nicht erwachten, wurde die Petrischale konstant mit CO₂ begast. Um in das Ganglion injizieren zu können, wurde ein (möglichst kleines) Fenster ventral über dem Ganglion geöffnet. Dabei war entscheidend, das Fenster nicht abzuschneiden, sondern lediglich „aufzuklappen“, da die Tiere ansonsten nicht über längere Zeit lebensfähig waren. Das Gewebe zwischen Cuticula und Ganglion wurde unter ständiger Entfernung überschüssiger Hämolymphe vorsichtig neben das Ganglion geschoben. Anschließend wurde die Ganglien haut mit einer Mikrokapillare durchstoßen und ca. 0,2 µl dsRNA-Lösung (ca. 1 µg/µl) im Ganglion abgesetzt. Nach der Injektion wurde die Mikrokapillare schnell entfernt und das Cuticula-Fenster zugeklappt. Um die Wundheilung zu verbessern, wurde das Cuticula-Fenster durch eine Knetmanschette mit leichtem Druck auf der Wunde fixiert. Die gesamte Injektionsprozedur (beginnend mit der Betäubung) dauerte ca. 2 min. Anschließend wurde die CO₂-Zufuhr eingestellt, die Tiere blieben jedoch weiterhin

fixiert. Über ein nasses Stück Filterpapier wurde den erwachenden Tieren die Möglichkeit geboten, ihre Flüssigkeitsreserven aufzufüllen. Durch ein gelartiges körpereigenes Wundsekret war die Wunde i.d.R. nach 2 h wieder versiegelt und die Tiere konnten aus der Fixierung gelöst und für weitere Experimente eingesetzt werden.

2.16.2.2 Injektion von dsRNA ins Abdomen subadulter und adulter männlicher Grillen

Die Injektion von dsRNA ins Abdomen subadulter und adulter Tiere wurde mit einer 25 µl-Hamilton-Spritze durchgeführt. Dabei wurden die Tiere ohne Betäubung so gehalten, dass eine Injektion in den hinteren Bereich des Abdomens durchgeführt werden konnte. Bei jeder Injektion wurden 5 oder 10 µl dsRNA-Lösung (ca. 1 µg / µl) durch eine Mikrokapillare ins Abdomen injiziert.

2.17 Genetische Arbeiten

2.17.1 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

P-Elemente sind Sequenzen, die durch zwei jeweils begrenzende 31 bp lange, gegenläufige Wiederholungssequenzen (inverted repeats) und zwei jeweils 11 bp lange sog. direct repeats gekennzeichnet sind. Im ursprünglichen Zustand beinhaltet die Sequenz eines P-Elements eine Transposase, die es ihm ermöglicht, im Genom zu springen. Um stabile P-Element-Insertionslinien zu erhalten, wurden in dieser Arbeit P-Elemente verwendet, die keine Transposaseaktivität besitzen. Damit jedoch zumindest die einmalige Insertion gewährleistet werden kann, müssen derartige P-Element-Vektoren (in dieser Arbeit pCaSpeR hs-act) zusammen mit sog. Hilfsvektoren, die nicht selbst integrieren können, aber Transposaseaktivität besitzen (in dieser Arbeit $\pi 25.7wc$), in die Keimzellen eingeschleust werden. Um transformante Tiere zu erkennen, besitzt der Vektor pCaSpeR hs-act ein im P-Element integriertes sog. *Miniwhite*-Gen. Nach einer Rückkreuzung der F0-Generation (=injizierte w^{1118} Embryonen) mit dem weißäugigen w^{1118} -Stamm wird das Reportergen *Miniwhite* in den Transformanten exprimiert und erzeugt eine gelbe bis hellrote Augenfarbe.

2.17.1.1 Fliegenzucht

Alle Fliegenstämme wurden in Hartplastikgefäßen mit Schaumstoffstopfen auf Standardmedium gehalten. Vor dem Besatz mit Fliegen wurden die Gefäße mit je einem

Tropfen Frischhefe „angeimpft“. Die Stämme wurden bei RT gehalten, Kreuzungen wurden in der Regel bei 25°C durchgeführt.

2.17.1.2 Eiablage

Die Gewinnung von Embryonen für P-Element-Transformationen erfolgte auf Apfelagarplatten (1l Apfelsaft, 30 g Agar), die zur besseren optischen Kontrolle mit etwas Johannisbeersaft eingefärbt waren. Zur Stimulation der Eiablage wurde die Oberfläche der Apfelagarplatten mit etwas frischer Bäckerhefe und einem Tropfen 5%-iger Essigsäure bestrichen. Um möglichst junge Embryonen zu erhalten, wurden diese alle 30 min mit Embryosaline (0,7% NaCl; 0,03% Triton X-100) von den Platten in ein kleines Metallsieb gespült.

2.17.1.3 Dechorionisierung und Montage der Embryonen

Die Embryonen wurden durch 90 sek. Inkubation in Klorix-Dechorionisierungspuffer (50% Klorix in Embryosaline (0,7% NaCl; 0,03% Triton X-100)) dechorionisiert. Danach wurden die Embryonen mehrmals gut mit Embryosaline gespült. Zur Montage wurden die Embryonen mit einem Pinsel aus der Embryosaline entnommen und auf einem Agarblock in Gruppen von jeweils 10 Embryonen waagerecht übereinander aufgereiht. Dabei wurden die Mikropylen immer gleich orientiert, damit die Injektion zügig von einer Seite erfolgen konnte.

Die Embryonen wurden unter Verwendung eines mit Klebstoffgemisch (aus Tesapack mit n-Heptan extrahiert) beschichteten Deckglases aufgenommen. Das Deckglas wurde mit einem Tropfen 10S Voltalevöl auf einem Objektträger fixiert. Um den Innendruck vor der Injektion zu reduzieren, wurden die dechorionisierten Embryonen für 8 min etwas getrocknet. Danach wurden die Embryonen mit 10S Voltalevöl überschichtet und für die Injektion unter dem Mikroskop eingespannt.

2.17.1.4 Herstellung von Injektionskapillaren

Mit einem „Puller“ (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Firma Sutter, Novato, USA) wurden Pyrex-Glaskapillaren (Pyrex Brand, Corning Glass Works, New York, USA) auf einen Spitzendurchmesser von ca. 5 µm ausgezogen. Vor Benutzung einer Kapillare wurde deren Spitze mit einem Kapillarschleifer (H. Saur, Laborbedarf, Reutlingen) ca. 2 min in

einem Winkel von 30° aufgeschliffen. Um Verstopfungen durch Staubpartikel zu vermeiden, wurde die geschliffenen Kapillare sofort mit dem hydraulischen System verbunden, in einen Mikromanipulator eingespannt und mit der Spitze in 3S Voltalev Fluorocarbon Öl (Halocarbon Products, River Edge, USA) getaucht.

2.17.1.5 DNA-Injektionslösung

Das Konstrukt aus dem um *Gryllus bimaculatus nonA*-DNA ergänzten Vektor pCaSpeR hs-act (P-Element-Vektor) wurde mit p π 25.7wc (Helferplasmid)-DNA im Verhältnis 2:1 gemischt und über eine Säule (segenetic, Borken) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wurde anschließend mit Injektionspuffer (5 mM KCl; 0,1 mM NaPO₄, pH 6,8) aus der Membran eluiert und auf ca. 200 ng/μl P-Element Vector zu 100 ng/μl Helferplasmid verdünnt.

2.17.1.6 Mikroinjektion

Für die Injektion wurde ein Tropfen DNA-Lösung (1-2 μl) auf einen silikonisierten Objektträger neben die bereits justierte, im Öl befindliche Injektionsnadel pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde die Kapillare vom Öl in die DNA-Lösung eingetaucht und der Tropfen mit Hilfe eines luftgefüllten Mikroinjektionssystems aufgenommen.

Die mit DNA-Lösung gefüllte Injektionskapillare wurde von posterior in den Embryo eingeführt und ein Tropfen Lösung im Polplasma abgesetzt. Embryonen, die aufgrund ihres Alters bereits Polzellen gebildet hatten, wurden nicht injiziert. Die nicht injizierten Embryonen wurden im Anschluss an die Injektion manuell abgetötet.

Danach wurden die Deckgläser mit den Embryonen in eine Petrischale überführt und mit 3S Voltalevöl überschichtet. Bei ca. 18°C schlüpften die Larven nach 30-40h. Die Larven wurden einzeln abgesammelt und in Aufzuchtgefäße mit Standardfliegenmedium und frischer Bäckerhefe überführt. Die Aufzuchtgefäße wurden anschließend bis zum Schlupf der Adulti bei RT inkubiert.

2.17.1.7 Isolierung transgener *Drosophilae*

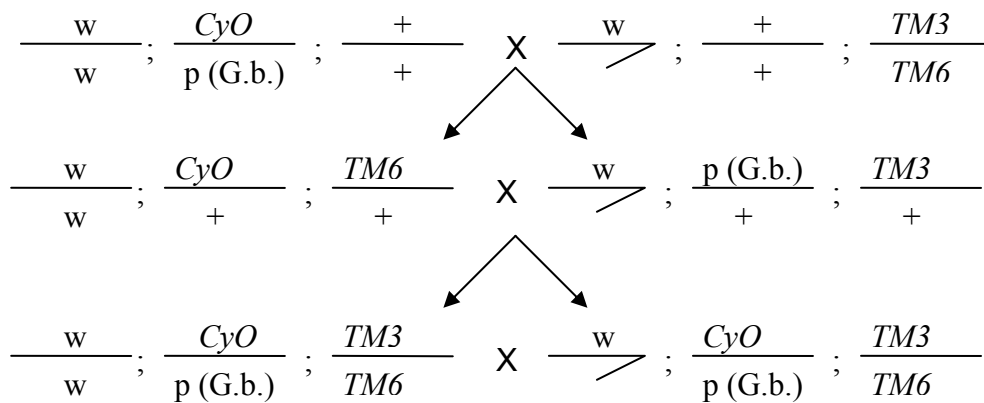
In Einzelkreuzungen wurden die als Embryonen injizierten Tiere (Empfängertiere) gegen Fliegen des Empfängerstammes (*w¹¹¹⁸*) zurückgekreuzt. Die Nachkommenschaft dieser

Kreuzungen, die F1-Generation, wurde auf rotäugige Individuen (= transgene Individuen) selektioniert. Um die chromosomale Lokalisation einer Insertion zu bestimmen, wurden die transgenen Fliegen gegen Stämme mit Insertionsmarkern ($w; Tft/CyO$ und $w; TM3, Sb/TM6, Tb$) gekreuzt. Durch die Segregation des Insertionsmarkers in der Folgegeneration wurde die chromosomale Lokalisation der Insertion enthüllt.

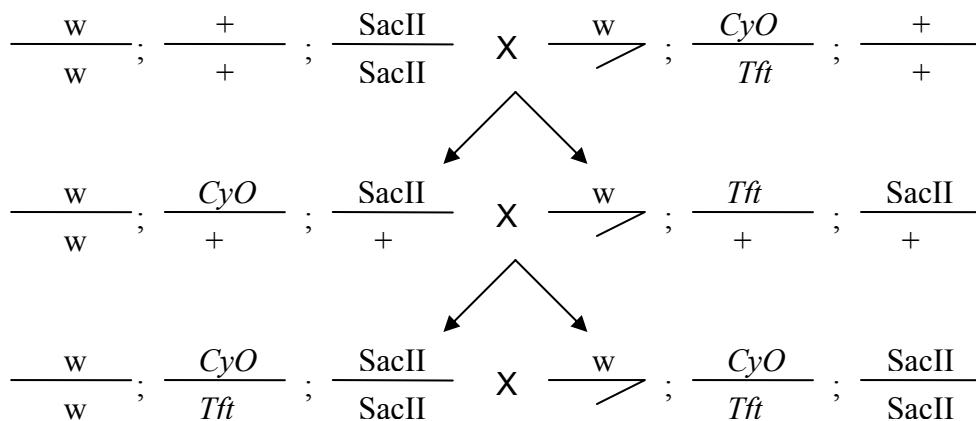
2.17.2 Kreuzungen von *Drosophila melanogaster*

Aus folgenden Kreuzungsschemen lassen sich alle in dieser Arbeit untersuchten *Drosophila*-Stämme ableiten.

Kreuzungsschema 1:

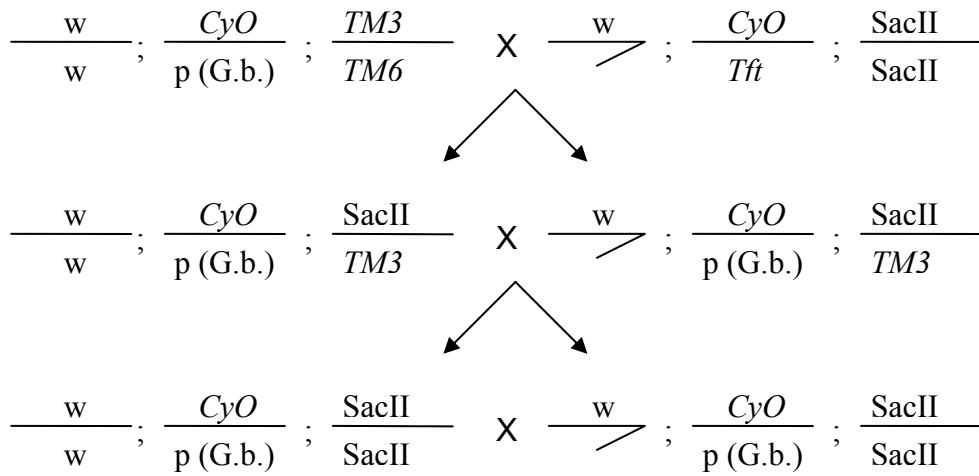


Kreuzungsschema 2:

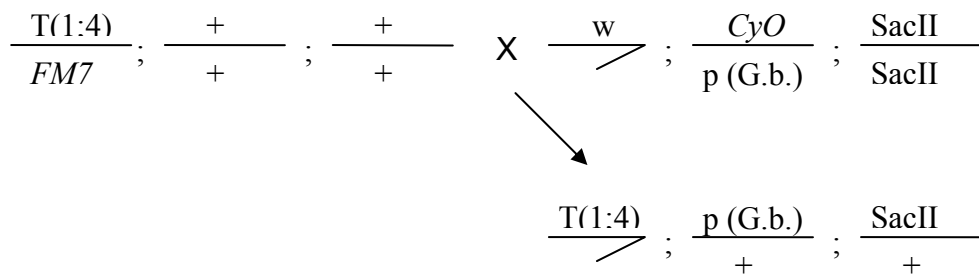


Die Selektion von $SacII/+$ gegen $SacII/SacII$ erfolgte über die Augenfarbe.

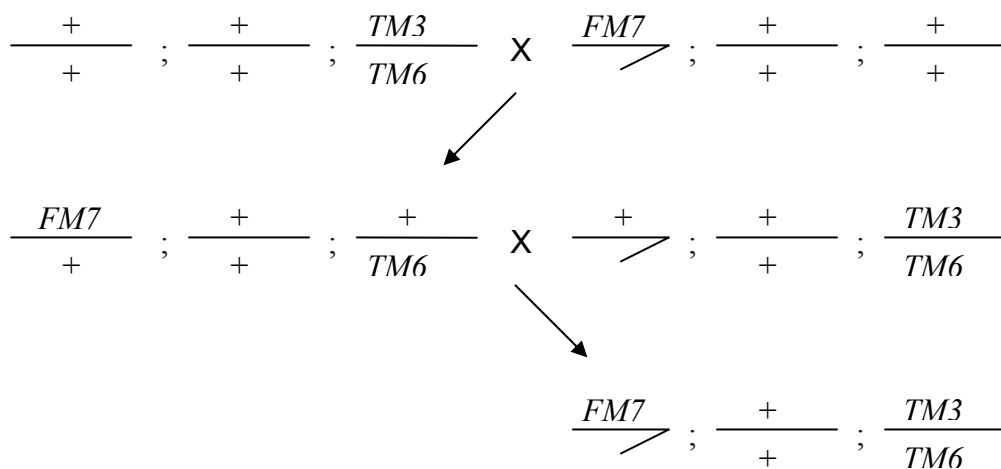
Kreuzungsschema 3:



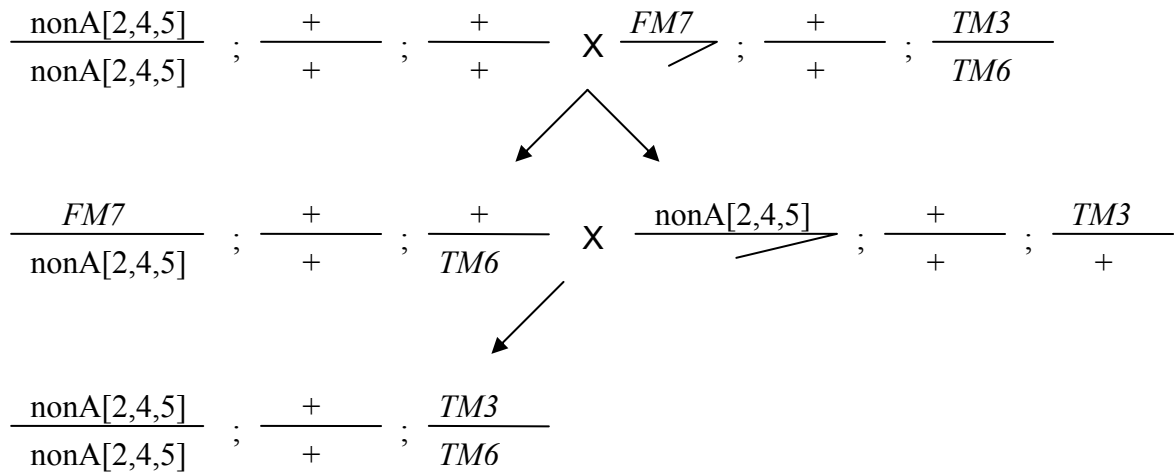
Kreuzungsschema 4:



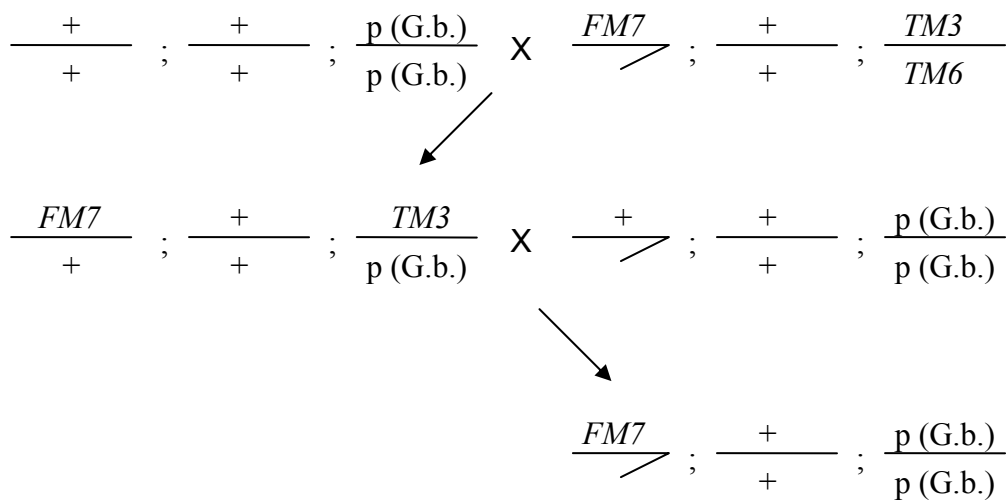
Kreuzungsschema 5:



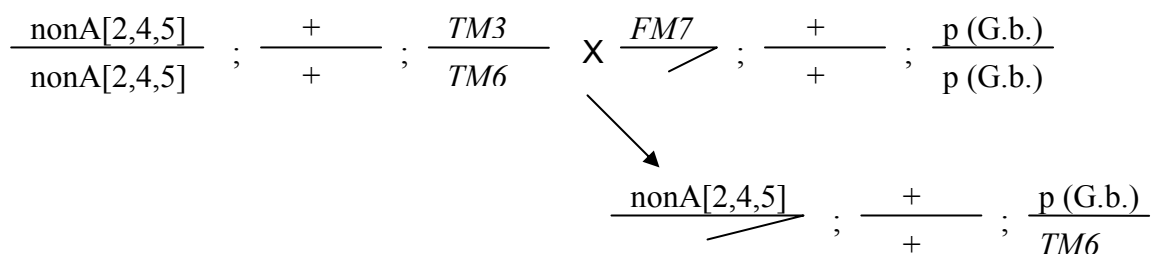
Kreuzungsschema 6:



Kreuzungsschema 7:



Kreuzungsschema 8:



2.18 Verhaltensbiologische Methoden bei *Drosophila melanogaster*

2.18.1 Test auf positive Phototaxis

Drosophilae wird die Möglichkeit gegeben, sich aus einer abgedunkelten Umgebung in Richtung einer Lichtquelle zu bewegen. Wildtypische *Drosophilae* zeigen immer eine stark positive Phototaxis. Aufgrund dieses Verhaltens konnten eine Vielzahl von Mutanten isoliert werden, deren phototaktisches Verhalten eingeschränkt oder nicht vorhanden ist (Pak *et al.* 1969). Zu diesen Mutanten gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten *nonA*-Mutantenstämme. Zur Quantifizierung von Verhaltensdefekten, und um graduelle phänotypische Unterschiede der zu testenden Genotypen effizient und dennoch sehr genau zu erfassen, wurden die Verhaltensversuche standardisiert im Phototaxisapparat nach Heisenberg durchgeführt (vgl. Stanewsky *et al.* 1993 & 1996).

Jeweils 20 Fliegen des zu testenden Genotyps wurden in Dunkelheit in das erste Röhrchen der Phototaxisapparatur gesetzt. Nach 2 min Eingewöhnungszeit wurden die Fliegen in das unbeleuchtete Röhrchen geklopft und anschließend das gegenüberliegende Röhrchen mit einer Lichtquelle (Osram, 60 Watt Glühbirne) bestrahlt. Den Fliegen wurde 20 sek. Zeit gegeben, um in das vom Licht bestrahlte Röhrchen zu gelangen (wildtypische Fliegen benötigen dafür ca. 10 sek.). Durch ein Verschieben der dem Licht zugewandten Röhrchen und anschließendes Abklopfen der Fliegen gelangen die phototaktisch aktiven Tiere in das nächste abgedunkelte Röhrchen. Dort bekommen sie dann erneut die Möglichkeit, in das beleuchtete Röhrchen zu wechseln usw. Somit hat jede Fliege fünfmal die Möglichkeit, vom Abgedunkelten ins beleuchtete Röhrchen zu wechseln. Am Ende des Tests wurde die Verteilung der Fliegen erfasst und die Anzahl der Läufe ermittelt. Dazu wurden die Röhrchen von 0 bis 5 (Läufe) nummeriert und diesen Wert mit der Anzahl der Fliegen im entsprechenden Röhrchen multipliziert. Die Addition der Einzelwerte ergibt dann einen sogenannten Verhaltensindex, der für wildtypische Fliegen im Idealfall (d.h. alle Fliegen zeigen immer phototaktisches Verhalten) 100 (20 x 5) betragen sollte.

2.19 Verhaltensbiologische Methoden bei *Gryllus bimaculatus*

2.19.1 Gesangsaufnahmen

Für die Aufnahme von Gesängen wurden die Grillenmännchen einzeln in Weck-Gläsern (Höhe 9,5 cm, Durchmesser: Boden 8 cm, oberer Rand 6,5 cm) mit Gaze-Deckel gesetzt (siehe Abb. 8). Der Boden der Gläser wurde mit Kies von 2-4 mm Körnung bedeckt. Jedes

Glas wurde zudem mit dem Stück eines Eierkartons, das als Versteck diente, ausgestattet. Der Gaze-Deckel (ein Drahtgewebe) der Gläser war luft- und geräushdurchlässig. Es wurde darauf geachtet, dass jedem Tier immer genug Futter und Wasser zur Verfügung stand. Das Futter wurde einfach auf den Bodengrund des Behältnisses gestreut. Über einen mit einem Draht am Gazedeckel befestigten und in Wasser getränkten Schwamm konnten sich die Tiere mit Flüssigkeit versorgen.

Im Abstand von 10 cm zur Öffnung des jeweiligen Glases wurde je ein Mikrofon befestigt. Jedes Versuchsglas wurde einzeln in ein mit Schaumstoff verkleidetes Regalfach gestellt, um die Mikrophone (geringe Reichweite) akustisch voneinander zu trennen (siehe Abb. 8).

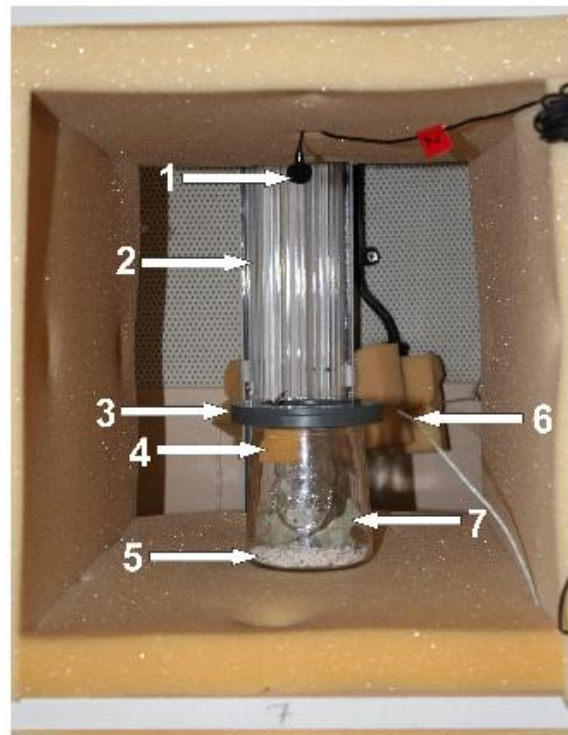


Abbildung 8: Halterung einer Grille während der Gesangsaufnahmen.

1: Mikrofon; 2: Lichtleiste; 3: Deckel mit Gaze-Aussparung; 4: Schaumstoff (in Wasser getränkt, Flüssigkeitsquelle); 5: Bodengrund (Kies, Sand); 6: Temperaturfühler; 7: Eierkarton (Versteckplatz).

Über Vorverstärker und Verstärker liefen 16 Kanäle in eine Aufnahmekarte, d.h. es konnten 16 Tiere gleichzeitig getestet werden (weitere Details siehe Punkt 2.7.2). Über eine von M. Hennig programmierte Software wurde jedes Mikrofon innerhalb einer Schleife für 250 ms vom Programm überwacht. Wurde innerhalb dieses Zeitfensters kein Gesang registriert, wechselte das Programm automatisch zum nächsten Mikrofon. Registrierte das Programm einen Gesang, so wurde dieser für ein vom Benutzer vorgegebenes Zeitfenster von i.d.R. 20 sek. auf die Festplatte des Computers aufgezeichnet.

Erreichte ein Tier die vom Benutzer festgelegte Anzahl vollständiger Gesänge (keine Pause größer als 5 sek., mindestens 300 Pulse), so wurden keine weiteren Gesänge über das entsprechende Mikrophon aufgezeichnet.

Da bekannt ist, dass Grillengesänge mit der Umgebungstemperatur variieren (Alexander 1957; Kutsch 1969; Doherty 1985), wurde die Temperatur durch einen Datenlogger alle 5 sek. direkt in den Rechner übertragen.

2.19.2 Tageszeitliche Gesangsaktivität

Um festzustellen, ob sich die Gesangsaktivitätszeiten behandelter Tiere von denen un behandelter Tiere unterscheiden, wurde die Scantiefe reduziert und die Aufnahmezeit auf 5 sek. gesetzt. Dadurch war es möglich, die Anzahl der möglichen Aufnahmen pro Grille zu verzehnfachen, ohne dass mehr Speicherplatz benötigt wurde. Ziel war es dabei, ausreichend Speicherplatz für die Aufnahme sämtlicher Gesangsaktivitäten eines vollen Tages zu schaffen.

Die zeitliche Gesangsaktivität wurde für jedes Individuum separat bestimmt, anschließend wurden die Individuen den Versuchsgruppen zugeordnet, die Daten zusammengefasst und mit SPSS ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Erstmals sequenzierte Nukleotidsequenzen von *Gryllus bimaculatus*

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, Sequenzabschnitte von Kandidatengen zu finden, die aufgrund ihrer Eigenschaften geeignet erschienen, um als Matrize für potente dsRNA zu dienen. Die Entschlüsselung vollständiger Gensequenzen war daher nicht erforderlich.

Aus der Literatur wurden vielversprechende Gene (i.a.R. von *Drosophila melanogaster*) identifiziert, die dazugehörigen Sequenzen wurden über Datenbanken (z.B. flybase, NCBI) ermittelt und anschließend mit bereits in Datenbanken vorhandenen Sequenzen verglichen (NCBI: blast_n, blast_p etc.). Ergaben die Analysen über mehrere Taxa Sequenzabschnitte, die gut konserviert waren, wurden anhand dieser Abschnitte degenerierte Primer ermittelt. Fehlten gut konservierte Sequenzen, wurden degenerierte Primer anhand von Sequenzen der nächst verwandten Taxa ermittelt.

Die im Folgenden aufgeführten Nukleotidsequenzen waren bisher nicht in Datenbanken vorhanden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass diese Sequenzen in dieser Arbeit erstmals in *Gryllus bimaculatus* nachgewiesen wurden. Es handelt sich dabei um Fragmente, die aufgrund ihrer Homologien zu Sequenzen verwandter Organismen, bestimmten Genen oder Gengruppen zugeordnet werden können. Im Anhang (5.2) sind Sequenzfragmente aufgeführt, die bei der Suche nach Kandidatengen zufällig amplifiziert wurden.

3.1.1 Nukleotidsequenzen von Kandidatengen

3.1.1.1 Cacophony (CAC, cac)

Der Name des *cacophony*-Gens (*cac*) von *Drosophila melanogaster* stammt von den typischen abnormen Unterbrechungen des Paarungsgesangs, die bei den ersten identifizierten Mutanten gefunden wurden (von Schilcher 1976). Diese Auswirkung einer Mutation des *cac*-Gens macht es zu einem interessanten Kandidatengen für die Fragestellung dieser Arbeit.

Bei CACOPHONY handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kalziumkanal. Dieser Kalziumkanal ist bei *Drosophila* an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt: u. a. am Kalzium-Ionen-Transport, an der Regulation des Synapsenwachstums, am männlichen Paarungsverhalten, an der Gesangsproduktion mit den Flügeln, am visuellen Verhalten sowie an der Phototransduktion.

Ein dem *cacophony*-Gen ähnliches Fragment von 2217 bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer und anschließender RACE-PCR amplifiziert (siehe Abbildung 9) (siehe 5.1: das vorliegende Produkt lässt sich über die Primer 75 & 11 amplifizieren).

```
GATGCAATTGTTTGGTGGTCAGTTCAATTTTGAAGATGAAACACCAGCCACAAATTTCAA-60
TACATTCCCTATTGCACTACTCACAGTCTTCCAGATCCTGACTGGGGAGGACTGGAATGA-120
AGTGATGTACCAAGGAATTTCGATCACAGGGAGGAAACAGTGGTGGCATGATCTATTCCCT-180
TTACTTTATAATTCTGGTGCTATTTGGCAACTACACTCTGCTCAATGTATTCTTGGCCAT-240
TGCTGTTGACAACCTGGCCAATGCGCAGGAAGTACAGCTGCTGAAGAGGAACAGGAGGA-300
GGAAGATAAAGAGAAAACAACAACAGGAGCTGGAGAAAGAGATGGAAGCCCTGCAGCTAAT-360
GGGTAGTGGGGGCTCTCCCCAAAAGTGGAAATCTGTCTCTCTCCCCAACGCACAACCTT-420
TAAAGGAAAAACAACAATAAGAAGGAGGAAGAAAAGAAAGAGGAAGATGAAGACATGAC-480
GGGACCCAAACCAATGTTGCCATATTCGTCCATGTTCAATTTTCTCACCACCTAATCCAGT-540
TCGCCGTGGTGCGCATTGGGTTGTTAATATGAAGTATTTTACTTTTTTCAATTATGGTAGT-600
TATCAGTCTTAGTAGCATAGCTTTGGCTGCTGAAGACCCTGTAGATGAAGATTCAGAGCG-660
CAACCATATATTGGATTATTTTGAATTATGCCTTCACTGGGGTCTTCACCATAGAAATGAT-720
ACTTAAGATTCTTGATCTTGGCATCATATTACATCCTGGTTCATATCTTCGGGAATTTTG-780
GAACATAATGGATGCCGTTGTAGTCATCTGTGCTGCTGTTTCTTTGCCTTCGATATGAC-840
AGGAAGTAAAGCAGGGCAGAATCTGTCCACAATTAAATCTCTGCGAGTGTTGCGAGTGTT-900
GAGGCCCTCAAAACCATCAAGCGTGACCAAAATTAAAGGCTGTGTTTGATTGTGTTGT-960
CAACTCGCTCAAGAATGTCATCAATATTCTCATAGTGACATTCTGTTTCAATTTATTTT-1020
TGCTGTAATTGCAGTCCAGTTATTTAATGGGAAATTTTTCTTCTGTAATGACGAAAGTCG-1080
GTTACCAAAGAGGATTGCCAGGGTCAATATTTTGTGTTATAATGGAGATGATGTTCCCTGA-1140
GGCAAAAGAGAGAAAATGGGACACTCAATCATTCCATTATGACAATGTAATGACAGCAAT-1200
GTTAACTACTCTTTGCCGTTCAAACAGGAGAAGGTTGGCCGCAAAATCTTCAAACTCTAT-1260
GGCTACAACCCAAGACAACAGGGGTCCCATTCAAATATATCGCATAGAAATGTCTATCTT-1320
CTATATTGTTTATTTTGTAGTATTCCCTTTCTTCTTTGTAAATATTTTGTGGCTTTGAT-1380
AATCATCACATTTCAAGAACAGGGTGAAGCAGAATTGCAGGATGGTGAATAGATAAAAA-1440
TCAGAAATCCTGCATTGATTTTACAATAGGAGCTCGGCCTTTGGAAAGGTATATGCCTAA-1500
CAAGAGAAATGGATTTAAGTACAAGATCTGGCGTATAGTTGTATCTACACCTTTTGAATA-1560
TTTCATAATGATCCTCGTTGTGTTCAATACTCTGCTGTTGATGATGAAGTATGACAACCA-1620
AAGCACATTTTATACAAGAATACTCTCCACTACATGAACATCGGGTTTACCGGCATGTTTA-1680
CCATTAAGTGTATTCTGAAGATTGTGGCTTATGGAGTTCGGAATTTCTTCAAAGATCCAT-1740
GGAACACATTTGATTTTCATCACTGTTATTGGCAGCATTGTAGATGTTTTGGTTATCGAAT-1800
TTGGGAAATTGCTCTATGGTGATGCACAGGAGAAATTCATCAACGTGGGTTTCTTACGCC-1860
TCTTCCGGGCGGCTCGGCTCATTAACCTCTTGAGGCAGGGCTACACCATCAGGATATTAT-1920
TATGGACATTTGTGCAATCCTTCAAGGCGCTGCCGTACGTCTGCCTCCTCATCGCCATGC-1980
TGTTTTTTTATCTATGCTATCATTGGCATGCAGGTCTTTGGTAACATTGCGCTGGATCCTG-2040
AAAGTTCATCACTCGCCATAACAACCTTTCGCAGCTTTGTGCAGGGTCTAATGCTGCTTT-2100
TCAGGTGTGCGACAGGTGAAGCTTGGCCGTCCATTATGTTGTCATGCATCAGTGGCGCTC-2160
CTTGTGATGATTTAGTTAAAAAACCTGCTCAATGTGGCTCCAACCTAGCATACGCCT-2217
```

Abbildung 9: Nukleotidsequenz der dem *Drosophila melanogaster* CAC-Protein ähnlichen Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*.

Die dem Fragment entsprechende Aminosäuresequenz (738 Aminosäuren (AA)) kann weitestgehend (AA 1-729) einem Bereich zwischen dem 2. Drittel der 2. Ionen-Transport-Domäne und dem Ende der 4. Ionen-Transport-Domäne (AA 586-1315) des *Drosophila*-Proteins zugeordnet werden (siehe Abbildung 10). Jede Ionen-Transport-Domäne besteht aus

6 transmembranen Helices, von denen jeweils die beiden letzten Helices eine extramembrane Schleife bilden, welche die Ionenselektivität (in diesem Fall Kalzium) bestimmt.

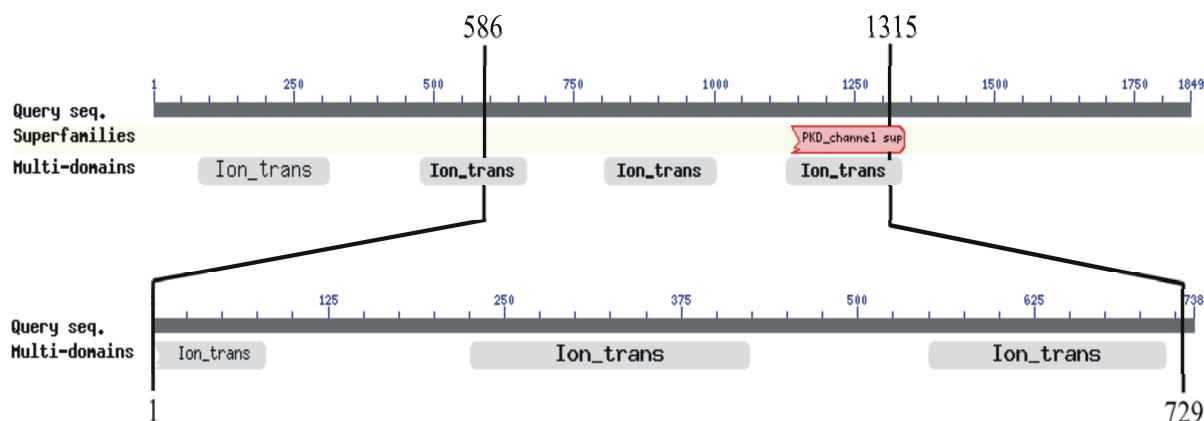


Abbildung 10: Vergleich des *Drosophila melanogaster*-CACOPHONY-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des CACOPHONY-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils oben: *Drosophila melanogaster*, darunter *Gryllus bimaculatus*: dunkelgrau: angegebene Aminosäuresequenz; roter Kasten: Glykoprotein-Polycystin-ähnliches Sequenzfragment; hellgraue Kästen: Ionen-Transport-Protein-Domäne.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des *Drosophila*-CAC-Proteins mit der Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*, so zeigt sich, dass die Aminosäuren zu etwa 80% identisch sind und weitere 8% die gleichen chemisch-physikalischen Eigenschaften besitzen (s. Abbildung 11).

Query	586	MQLFGGQFNLPGGTPETNFTNFPIALLTVFQILTGEDWNEVMYQGIISQGGAQKGMIIYSI	645
Sbjct	1	MQLFGGQFN TP TNFTNFPIALLTVFQILTGEDWNEVMYQGI SQGG GMIYS+	60
Query	646	YFIVLVLFNGNYTLLNVFLAIAVDN	669
Sbjct	61	YFI+LVLFNGNYTLLNVFLAIAVDN	84
Query	739	GPKPMLPYSSMFILSPTNPIRRGAHWVNLPYFDFIMVVISMSIALAAEDPVRENSRR	798
Sbjct	161	GPKPMLPYSSMFI SPTNP+RRGAHWVN+ YFDFIMVVIS+SSIALAAEDPV E+S R	220
Query	799	NKILNYFDYAFTGVFTIEMLLKIVDLGVILHPGSYLREFWNIMDAVVVICA AVSF GFDMS	858
Sbjct	221	NHILDYFDYAFTGVFTIEMILKILDGIIHPGSYLREFWNIMDAVVVICA AVSF FDM+	280
Query	859	GSSAGQNLSTIKSLRVLRLRPLKTIKRVPKLKAVFDCVVNSLKNVNVILIVYILFQFIF	918
Sbjct	281	GS AGQNLSTIKSLRVLRLRPLKTIKRVPKLKAVFDCVVNSLKNV+NILIVYILFQFIF	340
Query	919	SVIGVQLFNGKFFYCTDESKHTSAECQGSYFKYEEDELLPKQELRVWKPRAFHYDNVAAA	978
Sbjct	341	+VI VQLFNGKFF+C DES+ T +CQG YF Y D+ +P+ + R W ++FHYDNV AA	399
Query	979	MLTLFAVQTGEGWPQVLQHSMAATYEDRGPIQNFRIEMSI FYIYVIFVFPFFVFVNIFVAL	1038
Sbjct	400	MLTLFAVQTGEGWPQ+LQ+SMA T ++RGPIQ+RIEMSI FYIYVIF+VFPFFVFVNIFVAL	459

Query	1039	IIITFQEQGEAELQDGEIDKNQKSCIDFTIGARPLERYMPKRNNTFKYKVWRIVVSTPFE	1098
		IIITFQEQGEAELQDGEIDKNQKSCIDFTIGARPLERYMP RN FKYK+WRIVVSTPFE	
Sbjct	460	IIITFQEQGEAELQDGEIDKNQKSCIDFTIGARPLERYMPNKRNGFKYKIWRIVVSTPFE	519
Query	1099	YFIMMLIVFNTLLMMKYHNQGDMEYKSLKYINMGFTGMFSVETVLKIIIGFVKNFKDP	1158
		YFIM+L+VFNTLLMM + +Y+ +L Y+N+GFTGMF+++ +LKI+ +GV+NFFKDP	
Sbjct	520	YFIMILVVFNTLLMMSMTTKAHLYKNTLHYMNIGFTGMFTIKCILKIVAYGVRNFFKDP	579
Query	1159	WNIFDLITVLGSIVDALWMEFG-----DSNSINVGLRLFRAARLIKLLRQGYTIRIL	1211
		WN FD ITV+GSIVD L +EFG INVGLRLFRAARLIKLLRQGYTIRIL	
Sbjct	580	WNTFDFITVIGSIVDVLVIEFGKLLYGDAQEKFINVGFLRLFRAARLIKLLRQGYTIRIL	639
Query	1212	LWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGMQVFGNIKLGTVENSITRHNNFQSFIQGVML	1271
		LWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGMQVFGNI L E+SITRHNNF+SF+QG+ML	
Sbjct	640	LWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGMQVFGNIALDP-ESSITRHNNFRSFVQGLML	698
Query	1272	LFRCATGEAWPNIMLACLKGKACDDDAEKAPGEYCGSTLAYA	1313
		LFRCATGEAWP+IML+C+ G CDD +K P + CGS LAYA	
Sbjct	699	LFRCATGEAWPSIMLSCISGAPCDDLKVK-PAQ-CGSNLAYA	738

Abbildung 11: Aminosäuresequenzvergleich des *Drosophila melanogaster*-CAC-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des CAC-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils obere Zeile (Query): *Drosophila melanogaster*; mittlere Zeile, gelb hinterlegt: Konsensussequenz (AA = identische, + = gleiche Eigenschaften, Leerzeichen = keine Homologie); untere Zeile (Sbjct): *Gryllus bimaculatus*.

Aufgrund der oben beschriebenen Homologien ist davon auszugehen, dass es sich bei der aus *Gryllus bimaculatus* amplifizierte Sequenz um ein Homolog des *cacophony*-Gens aus *Drosophila melanogaster* handelt.

3.1.1.2 *nonA* (NONA; *nonA*)

Die ersten Allele des *nonA*-Gens (*no-on-transientA*) von *Drosophila melanogaster* wurden aufgrund ihres veränderten Elektroretinogramms (ERG) isoliert, bei dem die für den Wildtyp charakteristischen Erregungsmuster in Folge des An- oder Ausschaltens eines Lichtreizes fehlten (Pak et al. 1969). Seither sind eine Vielzahl von Mutanten isoliert worden, die z.B. das männliche Paarungsverhalten, die Phototaxis, den Werbegesang oder das visuelle Bewegungsverhalten beeinflussen.

Auf molekularer Ebene ist NONA an mRNA- und Nukleotid-Bindungsprozessen beteiligt.

Eine dem *nonA*-Gen ähnliche Sequenz von 1689 bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer und anschließender RACE-PCR amplifiziert (siehe Abbildung 12) (siehe 5.1: das angegebene Produkt lässt sich über die Primer 123 (mit Schnittstelle) und 101 (mit T7 Sequenz) amplifizieren).

```

ATGTCTGGTGGTCCTACTGAAATGAAAAGTGAAGGAGAACGCGATACAAATGGACCCCAG-60
GAGCAACCTGGGCAGAATTCTCACCCCGGCGGTCCGCGCGGTGGACGTGGCGGCGGTGGC-120
GGTGGTCTTGGACGCCAAAGGTTTCGGCGGCCAAGGACGTGGAGGAAGAGACGATTCAAGG-180
ATGAGAAATCAAGATATTAAGTCTGACATGAAATTTGGATGTAGAAGGTGGTCTTGGTGGT-240
CAGGGGGCTATGATGGGACCTGGGGGTCTTGGGCGTGGAGGTGGTCGTATCAACAGGTTTC-300
AGAGGTGGCATCGGAGGAGCGGGACGTGATGAAAGAGGCATGCGGTACACAGGATGATCGT-360
CTCAATGAAAGACTTGCCGCTCTGCAAGCTCCAACCTCATGATTTACCTCCACAAGACACA-420
CATGAGAAGAAGTTCTCTGGGCGTTGTCTGTTTATACATTGGTAATTTGACTAATGATGTG-480
ACGGAGGAAGAAATCAGCCAGTTATTTGCACCGTATGGAGAAACAGCAGAATTGTTTGTC-540
AACAAGGAAAAGAACTTTGCATTTATTCGCCTGGATTATAGAGCAAATGCTGAAAAGGCA-600
AAAAGAGAACTTGATGGATCTTTGAGAAAAGGTAGAGCTCTTAAAGTGCCTTTGCCCT-660
CATAGTGCTTGCAATTAAGGTGAAGAACCTTACACCTTGGGTACCAATGAATTGCTGGAG-720
AAAGCATTTTTCAGTGTTTGGTGAAGTTGAGCGTGCTGTTATAATTGTTGATGAGAGGGG-780
AAGTCAATGGAGGAAGGTATTGTAGAATTTGCCCGAAAACCGGGTGCACAGATGGCATTG-840
AGGAGGTGTACTGATGGCTGCTTCTTCTGACAGCGTCTTTGCGACCTGTAGTTGTGGAA-900
CCTTTTGAACAACTTGATGATGTTGATGGTTATGCTGAAAAGAATCTTCCAAAGAAAAAT-960
CCAGAATATTATAAGGCTCGGGAGGTTGGTCCTAGATTTGCTAATCCTGCAAGTTTTGAG-1020
TATGAATATGGTACTCGTTGGAAACAACCTATATGAACCTCATAAACAGAAGGAGGATGCT-1080
CTTAAACGGGAGATGAAAATGGAAGAAGAAAACTTGAAGCTCAAATGGAATATGCTCGT-1140
TATGAGCATGAACTGAAATTTTGGAGAGAACAACCTGAGACAGCGTGAACCTGATCGTGAA-1200
CGTCAAAAACGTGAGTGGGAGATGAAAGAGCGACAAGCAGAAGAACAGAGGATAGCTGAT-1260
GAAGAACGTATGAGACGTCAACAAGAAGAAATGCAGTTGCGGATGCATCATCAAGAGGAA-1320
GAACTGAGACGCAGGCAACAAGAGAACTCTCTCTTTATGCAGGCTCATCAGCTCAACAGC-1380
CTGCTTGACCAGCAAGAGCAGGCATTGAGGCAGACTCCTGCTGGCTATGATTCTCCATCA-1440
GCTGAGCAAGCGTTAAGAGATTATGATGCAGTTGGAGCTGGTCCAGGGAATATTCACCG-1500
GACCCGAAGTCTTTTATGGATGCGTACGACCGTGGAGCTGGACGCTACGATGGTCGCGGA-1560
GACATGCGTGAGGAAATGGGGGGTCTTAATGCCGGGCCACGTGGAGGAAACCCGCGTGGA-1620
CGCTGGGGCCAGAATGAACGTAGGGGTGGTGATGATTACCCTACCAACAAGAGGCGACGT-1680
TATTAATAA-1689

```

Abbildung 12: Nukleotidsequenz der dem *Drosophila melanogaster* NONA-Protein ähnlichen Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der zusammengesetzten Sequenz um eine vollständige mRNA handelt, da durch mehrere unabhängig voneinander durchgeführte 5'-RACE-PCR-Reaktionen ausschließlich identische 5'-Fragmente erhalten wurden und mittels 3'-RACE-PCR das 3'-Ende inklusive des Polyadenylierungs-Schwanzes amplifiziert wurde. Zudem konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die Masse des „original“ Grillenproteins und die Masse des oben beschriebenen, in *Drosophila melanogaster* eingesetzten und mittels Hitzeschockpromotor exprimierten Proteins übereinstimmen (vgl. 3.2.2 und 3.4.1.2).

Die der Nukleotidsequenz entsprechende Aminosäuresequenz (561 Aminosäuren (AA)) deckt sich in den wichtigsten funktionellen Bereichen der beiden RNA-Erkennungs-Motive (RRM = RNA Recognition Motif) mit der Referenzsequenz von *Drosophila melanogaster* (698 AA). Dieser Bereich hoher Homologie hat eine Länge von 349 AA, welcher bei *Drosophila melanogaster* dem Bereich zwischen AA 269 und AA 618, bei *Gryllus bimaculatus* dem Bereich AA 117 bis AA 446 entspricht. Neben den RRM-Domänen enthalten beide Proteine

eine NOPS-Sequenz (NOPS = NONA und PSP1-typische C-terminale Sequenz). Auffällig ist dabei, dass der Bereich in N-terminaler Richtung bei *Gryllus bimaculatus* um 152 AA verkürzt ist, wohingegen der C-terminale Bereich etwas länger (15 AA) ausfällt (s. Abbildung 13).

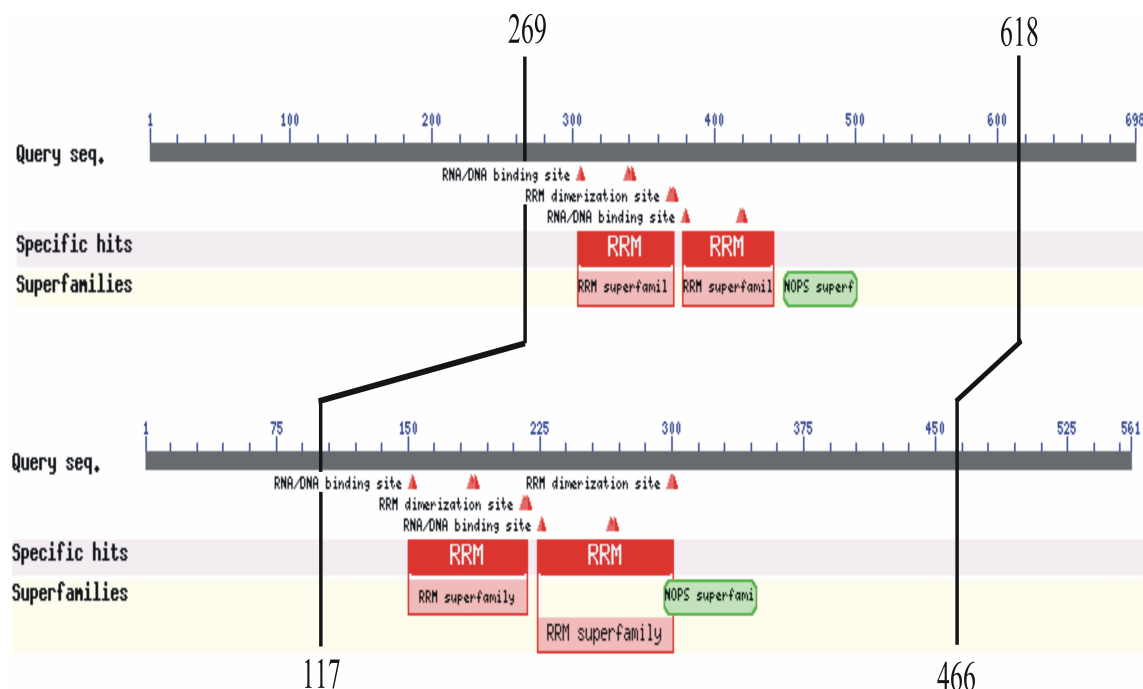


Abbildung 13: Vergleich des *Drosophila melanogaster*-NONA-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des NONA-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils oben: *Drosophila melanogaster*, darunter *Gryllus bimaculatus*. Grau: angegebene Aminosäuresequenz; rote Dreiecke: Erkennungssequenzen von RNA-Bindestellen oder RRM-Dimerisationsstellen (RRM = RNA Recognition Motif); rosa und rote Kästen: RRM-Domänen; grün: NOPS-Sequenz (NONA und PSP1-typische C-terminale Sequenz).

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des *Drosophila*-NONA-Proteins mit der Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*, so zeigt sich, dass die Aminosäuren zu 61% identisch sind und weitere 17% die gleichen chemisch-physikalischen Eigenschaften besitzen (siehe Abbildung 14).

```

Query  269  EDFFITQRLRSISGPTFELEPVEVPTETKFSGRNRLYVGNLTNDITDDELREMFKPYGEI  328
        +D  + +RL ++ PT +L P + E KFSGR RLY+GNLTND+T++E+ ++F PYGE
Sbjct  117  QDDRLNERLAALQAPTHDLPPQDTH-EKKFSGRCRLYIGNLTNDVTEEEISQLFAPYGET  175

Query  329  SEIFSNLDKNFTFLKVDYHPNAEKAKRALDGSMRKGRQLRVRFAPNATILRVSNLTPFVS  388
        +E+F N +KNF F+++DY NAEKAKR LDGS+RKGR L+VRFAP++ ++V NLTP+V+
Sbjct  176  AELFVNKEKNFAFIRLDYRANA EKAKREL DGLRGRALKVRFAPHSACIKVKNLTPWVT  235

Query  389  NELLYKSFEIFGPIERASITVDDRGKHMGE GIVEFAKKSSASACLRMCNEKCFFLTASLR  448
        NELL K+F +FG +ERA I VD+RGK M EGIVEFA+K A LR C + CFFLTASLR
Sbjct  236  NELLEKAFSVFGEVERAVIIVDERGKSMEEGIVEFARKPGAQMALRRCTDGCFFLTASLR  295

Query  449  PCLVDPMEVNDTDLGLPEKAFNKKMPDFNQERSIGPRFADPNSFEHEYGSRWKQLHNLFK  508
        P +V+P E DD DG EK KK P++ + R +GPRFA+P SFE+EYG+RWKQL+ L K

```

Sbjct	296	PVVVEPFQQLDDVDGYAEKNLPKKNPEYYKAREVGPRFANPASFEYEGTRWKQLYELHK	355
Query	509	TKQDALKRELKMEEDKLEAQMEYARYEQETELLRQELRKREVDNERKKLEWEMREKQAE K+DALKRE+KMEE+KLEAQMEYARYE ETE+LR++LR+RE+D ER+K EWEM+E+QAE	568
Sbjct	356	QKEDALKREMKMEEKLEAQMEYARYEHETEILREQLRQRELDREKREWEMKERQAE	415
Query	569	MRKREEETMRRHQTEMQSHMNRQEEDMLRRQEE-TLFMKAQQLNSLLDQEE R +EE MRR Q EMQ M+ QEE++ RRQEE +LFM+A QLNSLLDQEE	618
Sbjct	416	QRIADEERMRRQEEEMQLRMHHQEEELRRRQQENSLFMQAHQLNSLLDQEE	466

Abbildung 14: Aminosäuresequenzvergleich des *Drosophila melanogaster* NONA-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des NONA-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils obere Zeile (Query): *Drosophila melanogaster*; mittlere Zeile, gelb hinterlegt: Konsensussequenz (AA = identische, + = gleiche Eigenschaften, Leerzeichen = keine Homologie); untere Zeile (Sbjct): *Gryllus bimaculatus*.

Trotz des beschriebenen Größenunterschieds kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der entschlüsselten Sequenz und dem daraus resultierenden Protein um ein Homolog zum *Drosophila melanogaster nonA* bzw. NONA handelt. Diese These wird durch die zumindest teilweise Rettung von *Drosophila nonA*-Mutanten durch das *Gryllus bimaculatus*-Protein gestützt (siehe 3.4.2).

3.1.1.3 *fruitless* (FRU, *fru*):

Die ersten Allele des *fruitless*-Gens (*fru*) von *Drosophila melanogaster* wurden aufgrund ihres veränderten oder nur schwach ausgeprägten Paarungsverhaltens isoliert (Gaily & Hall 1989). Bei FRU handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an einer Reihe unterschiedlicher biologischer Prozesse beteiligt ist. Beeinflusst werden u.a. die Steuerung des Paarungsverhaltens (sexuelle Orientierung, sexuelle Motivation), sowie die systemische Entwicklung (besonders die Entwicklung des Nervensystems).

Eine dem *fru*-Gen ähnliche Sequenz von 186 bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert (siehe Abbildung 15) (siehe 5.1: das angegebene Produkt lässt sich über die Primer 63 & 64 amplifizieren).

```
CACTCTGGCCTGTGAAGGTGAAACATTCAAAGCTCATCAGACAATCTTGTCAGCCTGTAG-60
TCCATACTTCGAAAGTATATTTCTTCAAATACTCATCCACATCCTATTATTTTCCTTAG-120
AGATGTGAATTATGTAGAAATGAAAGCTTTGCTACAATTTATGTATAAAGGCGAAGTCAA-180
CGTGGG-186
```

Abbildung 15: Nukleotidsequenz der dem *Drosophila melanogaster*-FRU-Protein ähnlichen Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*.

Die aus dem Fragment abgeleitete Aminosäuresequenz (61 AA) entspricht weitestgehend der BTB-Domäne (BTB = Bric-a-brac/Tamtrack/Broad Complex) des FRU-Proteins aus *Drosophila* (siehe Abbildung 16). In allen bekannten BTB-Proteinen befindet sich diese Domäne in der Nähe des N-Terminus. BTB ist in der Lage, sowohl Homodimere als auch Heterodimere zu bilden. Zudem interagiert die BTB-Domäne mit Komponenten des Histon-Deacetylase-Komplexes. Damit kann FRU nicht nur die Transkription und die epigenetische Repression, sondern auch die Kontrolle des Zellzyklus und die Entwicklung des Organismus beeinflussen.

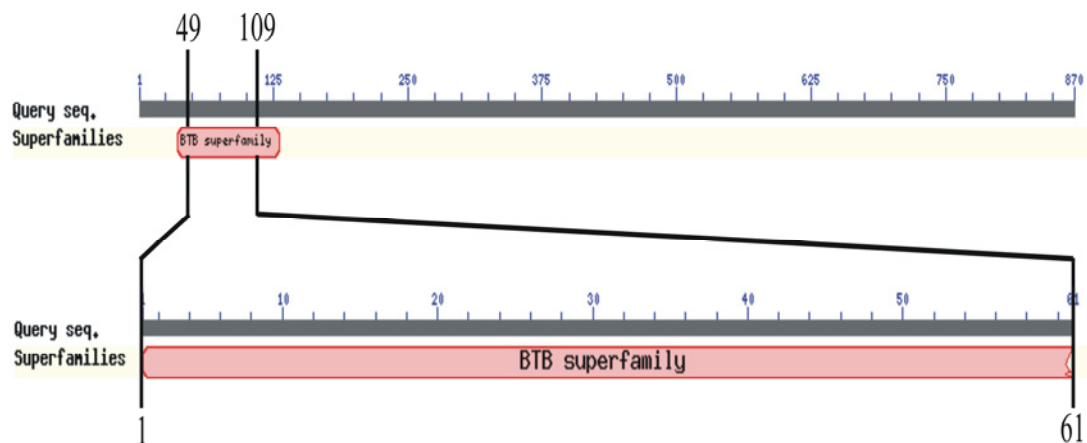


Abbildung 16: Vergleich des *Drosophila melanogaster*-FRU-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des FRU-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils oben: *Drosophila melanogaster*, darunter *Gryllus bimaculatus*: dunkelgrau: angegebene Aminosäuresequenz; roter Kasten: BTB-Domäne (BTB = Bric-a-brac/Tamtrack/Broad Complex).

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des *Drosophila*-FRU-Proteins mit der Sequenz aus *Gryllus bimaculatus*, so zeigt sich, dass die Aminosäuren zu 83% identisch sind und weitere 8% die gleichen chemisch-physikalischen Eigenschaften besitzen (siehe Abbildung 17).

```
Score = 112 bits (279), Expect = 3e-22
Identities = 51/61 (83%), Positives = 56/61 (91%), Gaps = 0/61 (0%)
Query 49 TLACEGETVKAHQ TILSACSPYFETIFLQNHPIIYLKDVRYSERSLDDFMYKGEVN 108
          TLACEGET KAHQTILSACSPYFE+IFLQN HPHPII+L+DV Y EM++LL FMYKGEVN
Sbjct 1 TLACEGETFKAHQ TILSACSPYFESIFLQNTHPHPIIFLRDVNYVEMKALLQFMYKGEVN 60

Query 109 V 109
          V
Sbjct 61 V 61
```

Abbildung 17: Aminosäuresequenzvergleich des *Drosophila melanogaster*-FRU-Proteins mit der translatierten Nukleotidsequenz des FRU-ähnlichen Proteins aus *Gryllus bimaculatus*.

Jeweils obere Zeile (Query): *Drosophila melanogaster*; mittlere Zeile, gelb hinterlegt: Konsensussequenz (AA = identische, + = gleiche Eigenschaften, Leerzeichen = keine Homologie); untere Zeile (Sbjct): *Gryllus bimaculatus*.

Obwohl es sich um ein sehr kurzes Fragment handelt, zeigten Sequenzvergleiche mit einer Vielzahl verschiedener Arten, dass der mit großem Abstand höchste Homologiegrad mit den jeweiligen FRU-Orthologen bestand. Bei der amplifizierten Sequenz handelt es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um ein *fruitless*-Homolog.

3.1.2 Nukleotidsequenzen anderer Gene

Eine Reihe vielversprechender cDNA-Klone und PCR-Produkte konnte nach der Sequenzierung Genen zugeordnet werden, die nicht in die Reihe der Kandidatengene fielen. Bei diesen Nebenprodukten handelt es sich um zufällig gefundene Sequenzabschnitte, die i.a.R. nur einmal sequenziert wurden und dementsprechend Fehler enthalten können. Da diese Sequenzabschnitte im Rahmen dieser Arbeit nicht von Bedeutung waren, sind die Sequenzen dieser Gene sowie eine kurze Beschreibung, im Anhang (5.2) zu finden.

3.1.3 Nukleotidsequenzen unbekannter Gene

Nukleotidsequenzen, die keine Homologien mit bereits bekannten Genen aufwiesen, wurden in der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgelegt.

3.2 dsRNA-Applikation im Nervensystem von *Gryllus bimaculatus*

Auf Grundlage der ermittelten Sequenzinformationen wurden dsRNAs der Kandidatengene hergestellt, um die korrespondierenden Gene durch RNA-Interferenz (RNAi) herunter zu regulieren und so Hinweise auf ihre Funktion in *Gryllus bimaculatus* zu erhalten. Alle verwendeten dsRNAs sind ebenso wie die dazugehörigen Primer im Anhang (siehe 5.1 und 5.3.2) aufgeführt. Die beiden dsRNAs wurden kurz vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt und direkt über die Injektionskapillare aufgenommen (siehe 2.16).

Erste Versuche, das *cacophony*-ähnliche Gen herunter zu regulieren, wurden abgebrochen, um sich auf Versuche mit *nonA*-dsRNA zu konzentrieren, nachdem ausreichende

Sequenzinformationen des *nonA*-Gens ermittelt worden waren. Der Hauptgrund für die Entscheidung, sich auf das *nonA*-Gen zu konzentrieren, ist in den Gentransfer-Experimenten von Campesan et al. (2001) zu finden. Diese Experimente legen die Vermutung nahe, dass NONA artspezifische Informationen des Balzgesangs enthält, da einige der Merkmale des *Drosophila virilis*-Gesangs bei *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden. Dementsprechend wurde die Priorität dieser Arbeit auf den Einfluss des *nonA*-Gens auf den Lockgesang von *Gryllus bimaculatus* gelegt.

Die Entwicklung einer Methode zur RNAi-Applikation im Nervensystem von *Gryllus bimaculatus* wird unter Punkt 2.16.2 beschrieben.

Wurden adulte Tiere (i.d.R. zwei Tage nach der Imaginalhäutung) injiziert, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der drei Behandlungsgruppen *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere und unbehandelte Tiere beobachtet werden (Kruskal-Wallis, $p=0,521$; zweiseitig).

Tiere, die als Subadulti injiziert worden waren (*nonA*-dsRNA- und *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere), zeigten jedoch große Probleme bei der Häutung zur Imago. Etwas mehr als die Hälfte (52,5%) dieser Tiere verstarben während der Imaginalhäutung. Tiere, die die Häutung überlebten, zeigten allerdings keine weiteren Unterschiede in der Überlebensfähigkeit im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kruskal-Wallis, $p=0,486$; zweiseitig).

Die durchschnittliche Lebenserwartung nach der Imaginalhäutung war für unbehandelte Tiere 32,6 Tage, für Tiere, die als Adulti mit *eGFP*-dsRNA injiziert worden waren ebenfalls 32,6 Tage, für Tiere, die als Adulti mit *nonA*-dsRNA injiziert worden waren 33,6 Tage, für Tiere, die als Subadulti mit *eGFP*-dsRNA injiziert worden waren 34,4 Tage und für Tiere, die mit *nonA*-dsRNA injiziert worden waren 34,5 Tage.

Abbildung 18 zeigt die absoluten Überlebenszahlen aller nach Etablierung der Methode in den Versuchen eingesetzten Grillen.

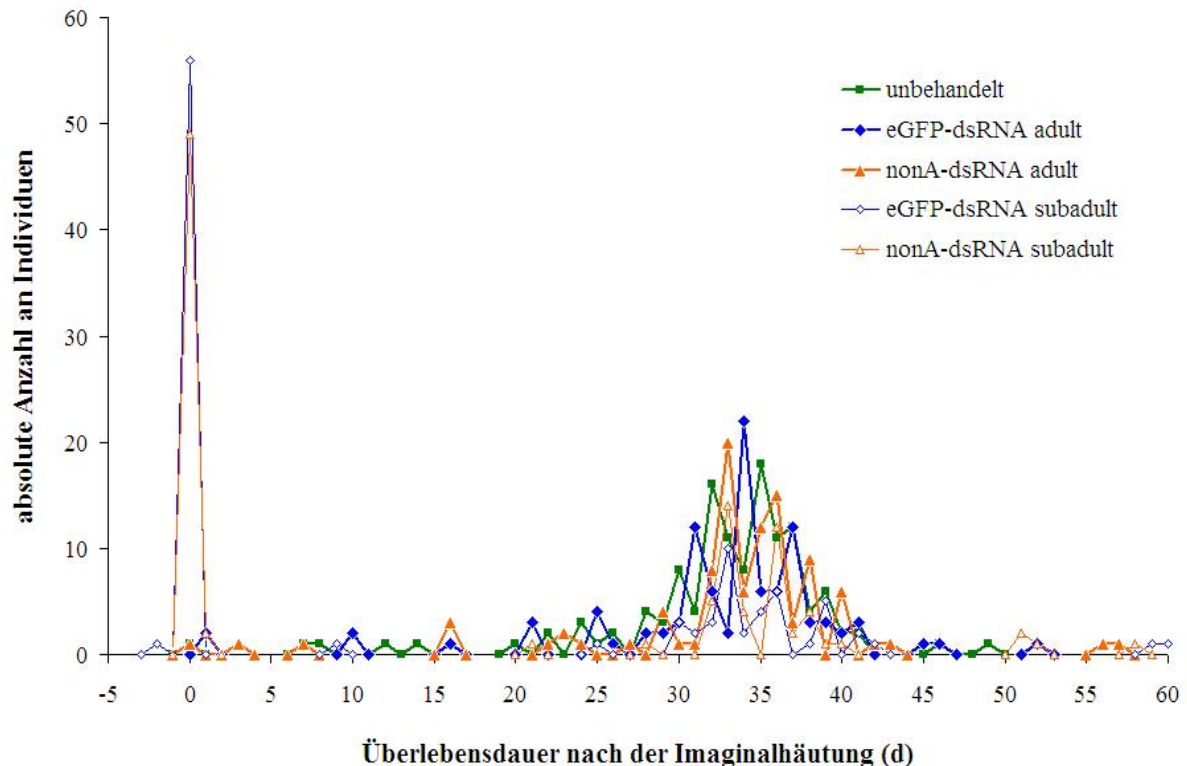


Abbildung 18: Überlebensdauer von *Gryllus bimaculatus* in Tagen nach der Imaginalhäutung (Zeitpunkt 0).

Grüne Quadrate: unbehandelte Tiere, gefüllte blaue Rauten: als Adulti *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, gefüllte orange Dreiecke: als Adulti *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, ungefüllte blaue Rauten: als Subadulti *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, ungefüllte orange Dreiecke: als Subadulti *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere.

Die Betäubung der Tiere mittels CO₂ während der Injektion wirkte sich im Vergleich zur Variante der Kältebetäubung sehr positiv aus. Zum Einen, weil die Tiere so gut wie keine Reaktionen während des Eingriffs zeigten, zum Anderen, weil sich die Kältebetäubung wesentlich schlechter „dosieren“ und zeitlich abstimmen ließ. Bei mit Kälte betäubten Tieren wurde während des Eingriffs häufig ein Zittern beobachtet, durch das die Injektion noch deutlich verstärkt wurde. In einigen Fällen führte dies dazu, dass sich die Position der Mikrokapillare relativ zum Einstichkanal oder zur Einstichtiefe im Ganglion so stark veränderte, dass es zu Durchstichen oder sogar zum Herausreißen der Kapillare aus dem Ganglion kam. Obwohl viele der kältebetäubten Tiere noch während des Eingriffs Reaktionen zeigten, erholten sie sich nach der Kältebetäubung nur sehr langsam (4-6 h) und zeigten oft auch noch 12 h nach dem Eingriff deutliche Koordinationsstörungen. CO₂-betäubte Tiere zeigten hingegen nach dem Lösen aus der Fixierung (nach 2 h) keinerlei offensichtliche Koordinationsstörungen.

3.3 Molekularer Nachweis von RNA-Interferenz in *Gryllus bimaculatus*

3.3.1 Nachweis von *nonA*-mRNA

Nach Etablierung der Injektionsmethode konnte nachgewiesen werden, dass die Injektion von *nonA*-dsRNA (siehe 5.3.2) ins Metathorakalganglion subadulter *Gryllus bimaculatus* zu einem derart starken Rückgang an *nonA*-mRNA in den adulten Tieren führt, dass dieses Transkript mittels RT-PCR (siehe 5.1: Primer 51 & 126) i.a.R. nicht mehr zu amplifizieren war. Bei adulten Grillen führte eine Injektion der dsRNA ins Metathorakalganglion zu einer deutlichen Reduktion der *nonA*-mRNA (d.h. es konnte deutlich weniger Produkt amplifiziert werden). Allerdings blieb in diesem Fall die Konzentration i.a.R. hoch genug, um mittels RT-PCR (siehe 5.1: Primer 51 & 126) nachgewiesen werden zu können. Die mit *eGFP*-dsRNA durchgeführten Kontrollen waren ebenso immer positiv wie die der unbehandelten Tiere. In Abbildung 19, Spalten 1-5 sind die „Median-Amplifikationen“ für *Gryllus bimaculatus* dargestellt (jeweils 5 RT-PCRs).

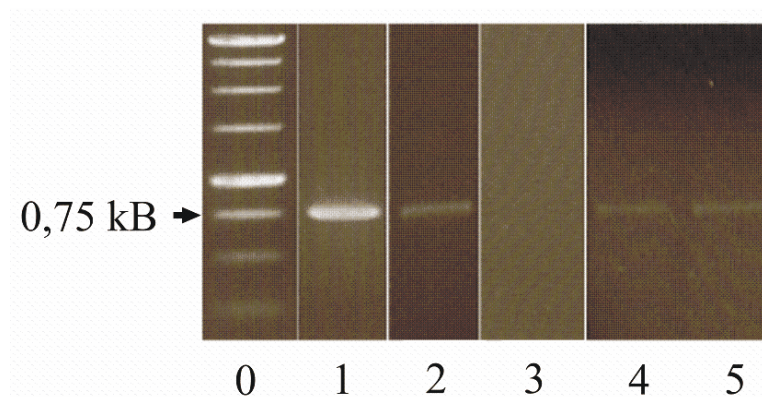


Abbildung 19: qualitativer Nachweis des *Gryllus bimaculatus nonA*-Transkripts mittels RT-PCR (40 PCR-Zyklen, siehe 5.1:

Primer 51 & 126) in *Gryllus bimaculatus*. 0 = DNA – Größenmarker; 1 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult unbehandelt, 2 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 72 h nach *nonA*-dsRNA-Injektion; 3 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 48 h nach Häutung, 72-96 h nach *nonA*-dsRNA-Injektion; 4 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 72 h nach *eGFP*-dsRNA-Injektion (5-fach verdünnt); 5 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult, 48 h nach Häutung, 72-96 h nach *eGFP*-dsRNA-Injektion (5-fach verdünnt).

3.3.2 Nachweis von NONA-Protein

Die oben beschriebenen Ergebnisse auf mRNA-Ebene wurden auf Ebene des NONA-Proteins bestätigt. Auch hier zeigt sich eine deutliche Reduktion, aber keine vollständige Abwesenheit des NONA-Proteins bei Grillenmännchen, die als Adulti injiziert worden waren. Das NONA-Protein konnte bei adulten Tieren, die kurz vor der Imaginalhäutung injiziert worden waren, nicht nachgewiesen werden. Unbehandelte Tiere (Spalte 1) sowie *eGFP*-dsRNA-behandelte Tiere (Injektion Adulti: Spalte 4; Injektion Subadulti: Spalte 5) weisen in etwa gleiche Mengen an Protein auf (siehe Abbildung 20).

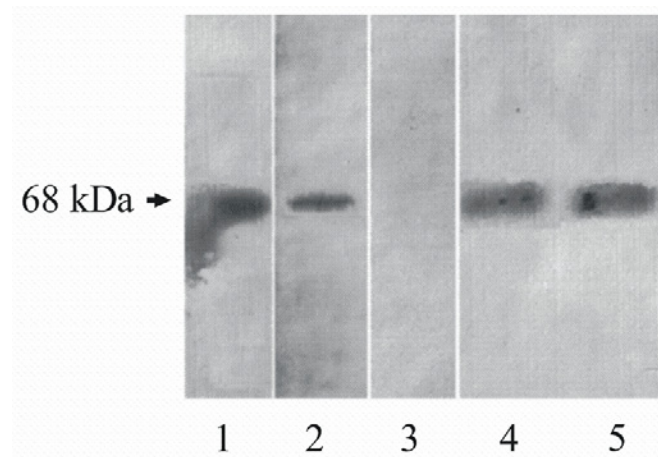


Abbildung 20: semiquantitativer Nachweis des *Gryllus bimaculatus*-NONA-Proteins durch *Gryllus bimaculatus*-NONA-Antikörper in *Gryllus bimaculatus*.

1 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult unbehandelt, 2 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 72 h nach *nonA*-dsRNA-Injektion (ca. 2-fach); 3 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 48 h nach Häutung, 72-96 h nach *nonA*-dsRNA-Injektion (ca. 2-fach); 4 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult 72 h nach *eGFP*-dsRNA-Injektion; 5 = *Gryllus bimaculatus* ♂ adult, 48 h nach Häutung, 72-96 h nach *eGFP*-dsRNA-Injektion.

3.4 Auswirkungen der RNA Interferenz auf den Lockgesang von *Gryllus bimaculatus*

Grundsätzlich ist der Lockgesang von *Gryllus bimaculatus* durch eine relative regelmäßige Aneinanderreihung von sog. Chirps gekennzeichnet. Die Chirps bestehen aus 3 bis 5 Silben, zwischen den Silben liegen Intersilben-Pausen und zwischen den Chirps befinden sich Interchirp-Pausen (siehe Abb. 21).

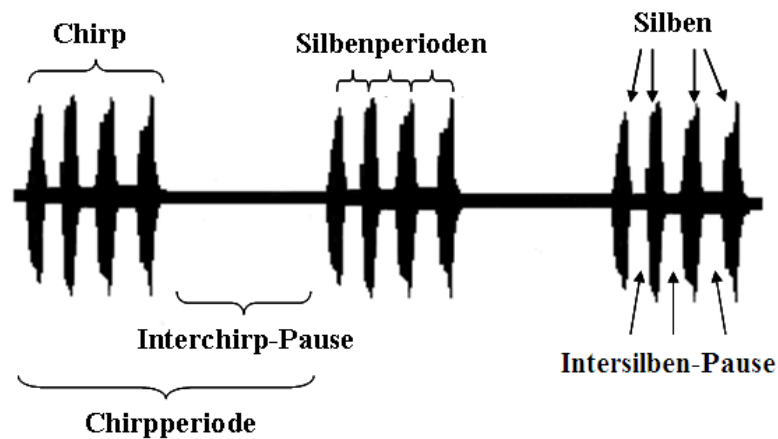


Abbildung 21: Oszillogramm eines Lockgesangs von *Gryllus bimaculatus*.

Das Diagramm zeigt drei Chirps mit jeweils vier Silben.

3.4.1 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die Periodenlänge von Gesängen.

Alle drei Behandlungsgruppen (*nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, unbehandelte Tiere) zeigen jeweils eine eindeutige Abhängigkeit der Periodenlänge von der Außentemperatur (Abb. 22). Für den Korrelationskoeffizienten ergeben sich folgende Werte: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere (Kendall's $\tau = -0,521$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig)), *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere (Kendall's $\tau = -0,563$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0.01 signifikant (2-seitig)), unbehandelte Tiere (Kendall's $\tau = -0,460$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig)).

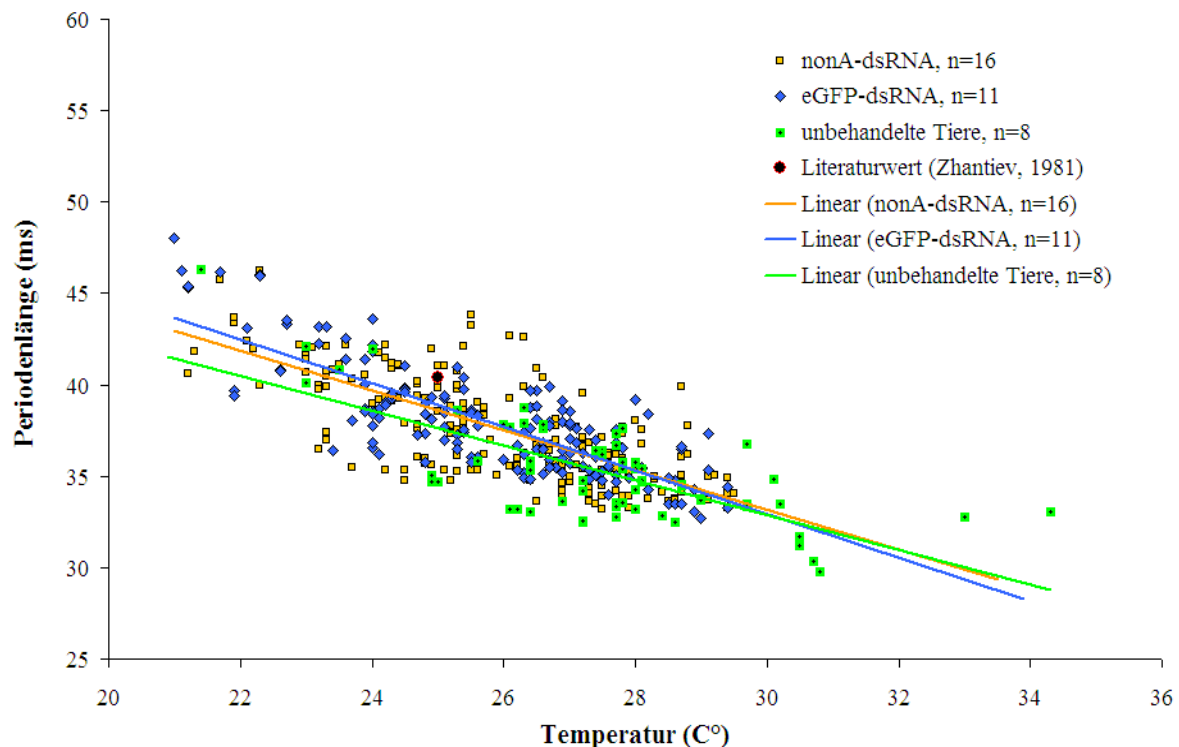


Abbildung 22: Periodenlänge von Lockgesängen bei *Gryllus bimaculatus* in Abhängigkeit von der Temperatur.

Orange Quadrate: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, blaue Rauten: *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, grüne Quadrate: unbehandelte Tiere, schwarzer Punkt: Literaturwert (Zhantiev, 1981), orange Ausgleichsgerade: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, blaue Ausgleichsgerade: *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, grüne Ausgleichsgerade: unbehandelte Tiere.

Es wurde eine imaginäre Ausgleichsgerade auf Grundlage aller Einzelmessungen ermittelt. Entscheidend für die weitere Auswertung ist, dass diese Ausgleichsgerade eine starke Korrelation ($p \leq 0,01$) zwischen Periodenlänge und Außentemperatur abbildet. Für jeden Einzelwert wurde anschließend der Abstand zur imaginären mittleren Ausgleichsgeraden bestimmt. Danach wurden diese Abstände in Rangzahlen umgewandelt und nach Kruskal-Wallis auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Die drei miteinander zu vergleichenden Gruppen (*nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, unbehandelte Tiere) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis, $p = 0,521$; zweiseitig).

Es konnten also keine Auswirkungen durch das Herunterregulieren des NONA-Proteins auf die Periodenlänge von Lockgesängen von *Gryllus bimaculatus* nachgewiesen werden.

Um jahreszeitliche bzw. zuchtspezifische Unterschiede auszuschließen, wurde die Abhängigkeit von Periodenlänge und Temperatur während der 4 Hauptmessperioden August 2006, Oktober 2006, November 2006 und April 2007 miteinander verglichen (s. Abb. 23).

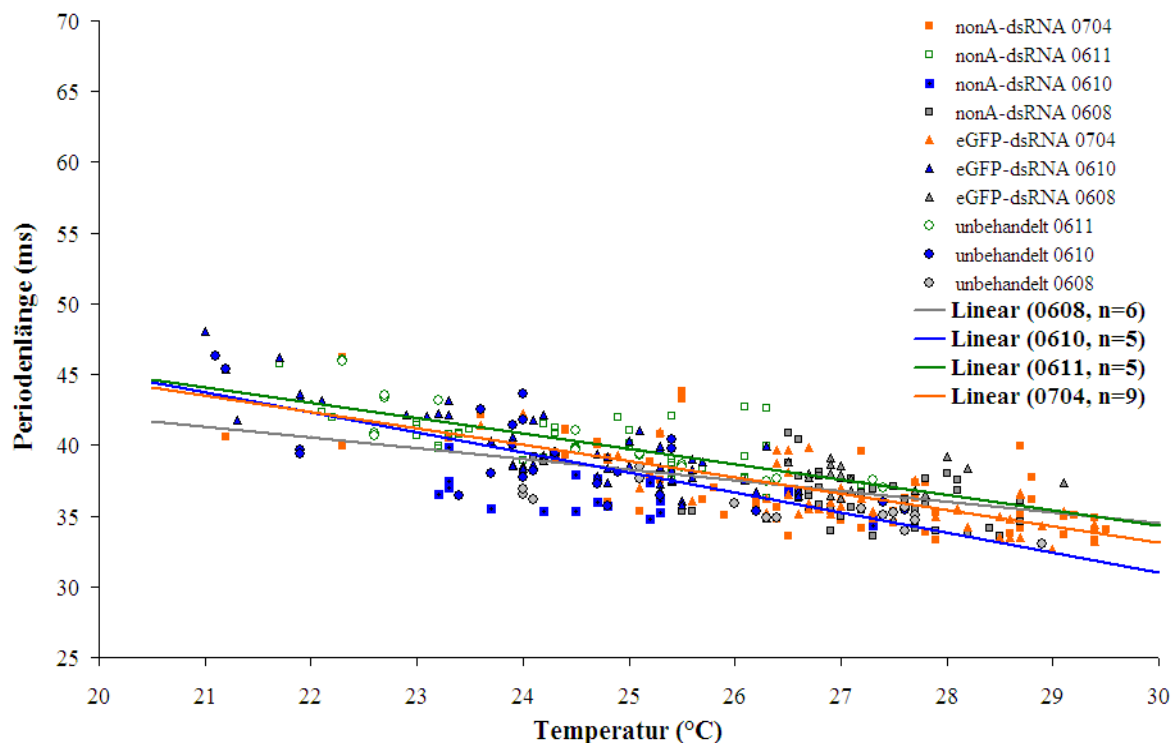


Abbildung 23: Periodenlänge in Abhängigkeit von der Temperatur während der 4 Hauptmessperioden.

Grau: Messperiode August 2006 (0608), blau: Messperiode Oktober 2006 (0610), grün: Messperiode November 2006 (0611), orange: Messperiode April 2007; Quadrate: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, Dreiecke: *eGFP*-dsRNA-injizierte Tier, Kreise/Punkte: unbehandelte Tiere.

Für den Korrelationskoeffizienten ergeben sich folgende Werte: August 2006: Kendall's $\tau = -0,316$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig); Oktober 2006: Kendall's $\tau = -0,218$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig); November 2006: Kendall's $\tau = -0,459$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0.01 signifikant (2-seitig); April 2007: Kendall's $\tau = -0,525$; Korrelation ist auf einem Niveau von 0.01 signifikant (2-seitig).

Zu beachten ist jedoch, dass aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren pro Behandlungsgruppe und Messperiode die unterschiedlichen Behandlungsgruppen der jeweiligen Messperiode zusammengefasst wurden. Dieses Vorgehen wird durch die zuvor gemachte Beobachtung, dass es keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gibt, gerechtfertigt.

Es wurde wie bereits beim Vergleich der Behandlungsgruppen eine Ausgleichsgerade auf Grundlage aller Einzelmessungen ermittelt. Entscheidend für die weitere Auswertung war dabei, dass diese Ausgleichsgerade eine starke Korrelation ($p \leq 0,01$) abbildet. Für jeden

Einzelwert wurde anschließend der Abstand zur imaginären mittleren Ausgleichsgeraden bestimmt. Danach wurden diese Abstände in Rangzahlen umgewandelt und nach Kruskal-Wallis auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Die vier miteinander zu vergleichenden Zeiträume (August 2006, Oktober 2006, November 2006 und April 2007) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis, $p = 0,243$; 2-seitig).

3.4.2 Individuelle Unterschiede in der Periodenlänge von Grillengesängen.

Vergleicht man einzelne Individuen innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen miteinander, so kann man zum Teil signifikante Unterschiede in Bezug auf die Periodenlänge in Abhängigkeit von der Außentemperatur feststellen (s. Abb. 24). Aus dem statistischen Vergleich dieser Tiere (Gbim-0610-0004 und Gbim-0610-0005) ergibt sich bei Anwendung des Mann-Whitney-Tests ein p-Wert von 0,015 ($z = -2,431$) d.h. die Individuen unterscheiden sich signifikant voneinander. Für vorhergehende und folgende Auswertungen hat dieser Befund jedoch keine weitere Bedeutung, da sich diese individuellen Unterschiede aufgrund der Anzahl der getesteten Tiere gegenseitig aufheben.

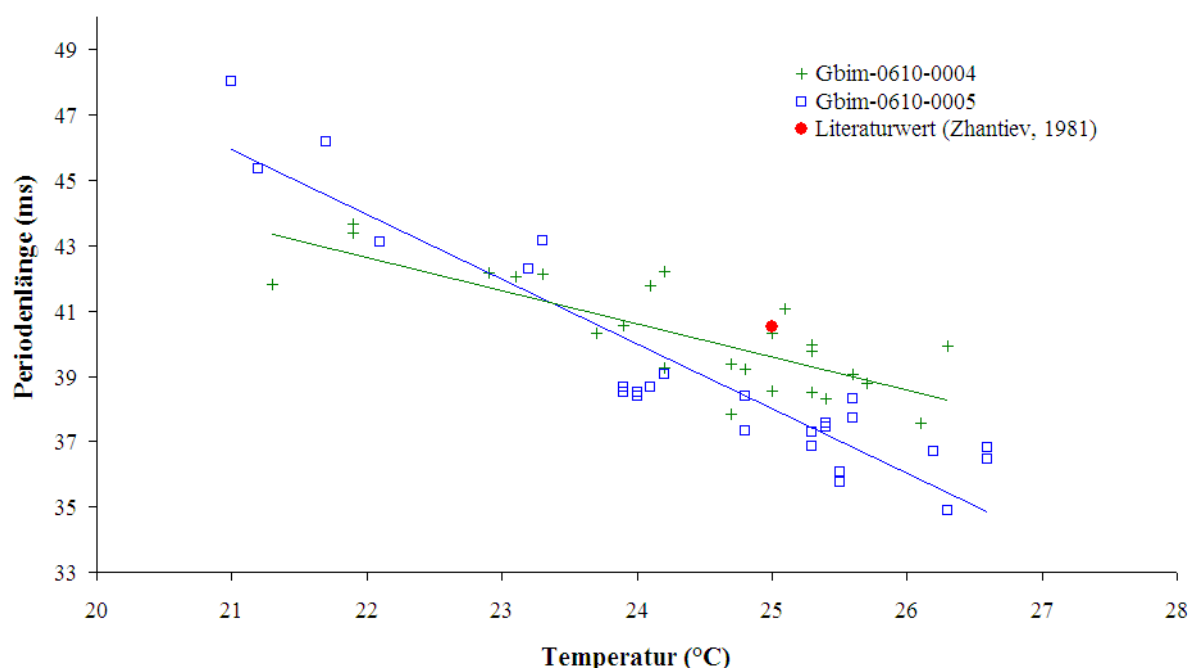


Abbildung 24: Periodenlänge von Lockgesängen der Art *Gryllus bimaculatus* in Abhängigkeit von der Temperatur bei zwei Individuen der gleichen Behandlungsgruppe (*eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere).

Grüne Kreuze: Tier Gbim-0610-0004, blaue Quadrate: Tier Gbim-0610-0005, roter Punkt: Literaturwert (Zhantiev 1981).

3.4.3 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die tagesperiodische Gesangsaktivität.

Um die Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die tagesperiodische Gesangsaktivität zu untersuchen, wurden alle aufgezeichneten Gesangsereignisse vier Tagesabschnitten zugeordnet. Da die Grillen in einem 12:12-Stunden Tag (09:00 - 20:59 Uhr) -Nacht (21:00 - 02:59 Uhr)-Rhythmus gehalten wurden, entsprachen diese vier Tagesabschnitte zwei reinen Tagesquartalen (09:00 - 14:59 und 15:00 - 20:59 Uhr) und zwei reinen Nachtquartalen (21:00 - 02:59 und 03:00 - 08:59 Uhr). Für die statistische Analyse wurden die erhaltenen Werte auf 100 Gesangsereignisse normiert.

Die beiden Tagesquartale und das zweite Nachtquartal unterschieden sich bezüglich der Gesangsaktivität in keiner der drei Behandlungsgruppen signifikant voneinander (*nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, unbehandelte Tiere; Friedman Test, $p=0,538$).

Der Wilcoxon Rang Test zeigte jedoch, dass die Grillen aller Behandlungsgruppen im ersten Nachtquartal (21:00 - 02:59 Uhr) eine signifikant höhere Gesangsaktivität zeigten als in jedem anderen Tagesquartal. Auf Grundlage der nach Holm abgewandelten Bonferoni-Korrektur waren alle lokalen α -Niveaus (globales α -Niveau 0,05) größer als die ermittelten p-Werte (einseitig). Für *nonA*-dsRNA injizierte Tiere ergaben sich folgende Werte: 1. Quartal (09:00 - 14:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$; 2. Quartal (15:00 - 20:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,037$; 4. Quartal (03:00 - 08:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$. Für *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere ergaben sich folgende Werte: 1. Quartal (09:00 - 14:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$; 2. Quartal (15:00 - 20:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$; 4. Quartal (03:00 - 08:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$. Für unbehandelte Tiere ergaben sich folgende Werte: 1. Quartal (09:00 - 14:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$; 2. Quartal (15:00 - 20:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,022$; 4. Quartal (03:00 - 08:59) gegen 3. Quartal (21:00 - 02:59): $p = 0,014$ (siehe Abb. 25).

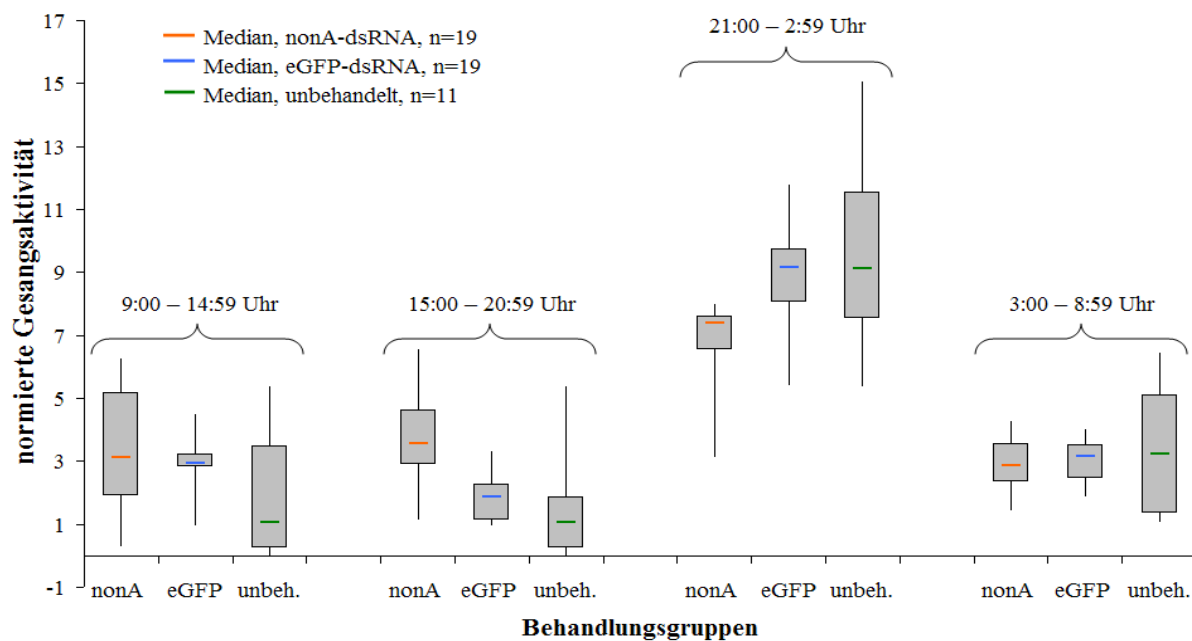


Abbildung 25: Normierte tagesperiodische Gesangsaktivität von *Gryllus bimaculatus*

Nach Einteilung in vier Tagesabschnitte zu zwei reinen Tagesquartalen (09:00-14:59 und 15:00-20:59 Uhr) und zwei reinen Nachtquartalen (21:00-02:59 und 03:00-8:59 Uhr), aufgeteilt in die drei Behandlungsgruppen: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere und unbehandelte Tiere. Darstellung in Boxplots: farbige Balken entsprechen dem Median, graue Rechtecke entsprechen dem 50%-Vertrauensintervall, schwarze Balken entsprechen dem Maximum bzw. Minimum.

Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ergaben sich nicht. Allerdings ist eine Tendenz zu einer geringeren Gesangsaktivität der mit *nonA*-dsRNA-injizierten Tiere im ersten Nachtquartal (21:00 - 2:59 Uhr) zu beobachten. Die Darstellung in Abbildung 26 verstärkt diesen Eindruck, zudem lässt sich hier auch eine entsprechend erhöhte Gesangsaktivität während des restlichen Tages erahnen. Kritische Aspekte der Datenerhebung werden unter Punkt 4.4.3 in der Diskussion erörtert.

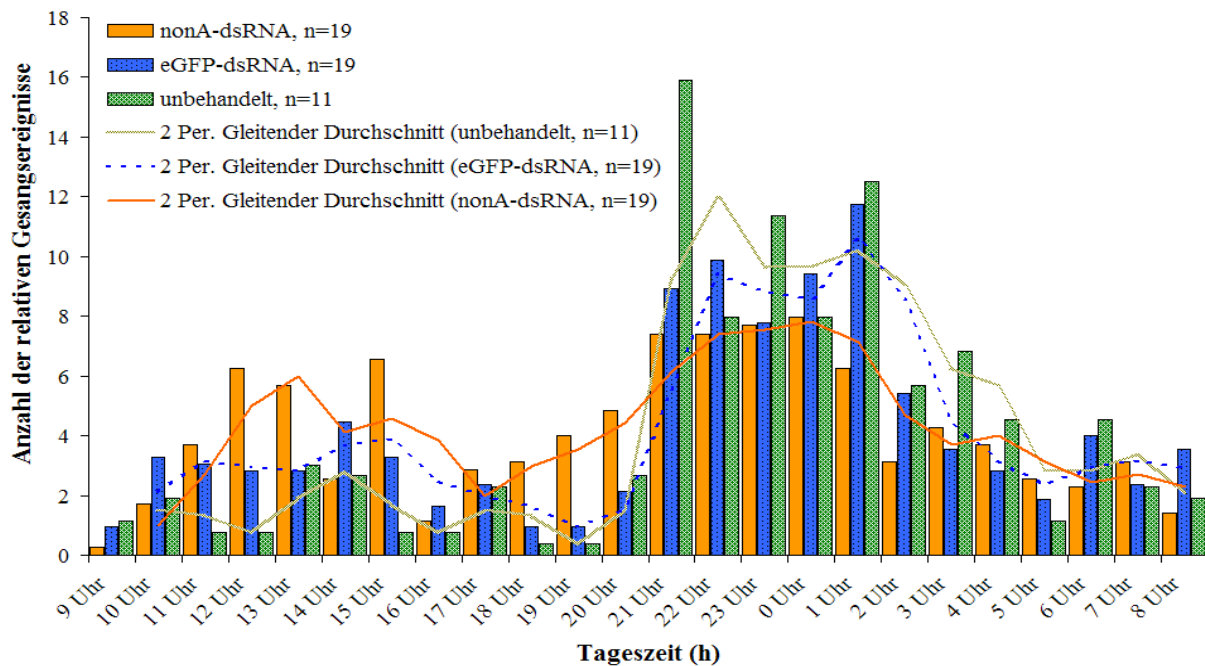


Abbildung 26: Anzahl der relativen Gesangsereignisse im Tagesverlauf.

Orange Balken: *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, blaue Balken mit Punkten: *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere, grün melierte Balken: unbehandelte Tiere, orange Linie: 2. periodischer Durchschnitt der *nonA*-behandelten Tiere, blaue Punkt-Linie: 2. periodischer Durchschnitt der *eGFP*-dsRNA-injizierten Tiere, hellgrüne Linie: 2. periodischer Durchschnitt der unbehandelten Tiere.

3.4.4 Auswirkungen der Herunterregulierung des NONA-Proteins auf die Silbenanzahl pro Chirp.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Bandbreite der Silben pro Chirp, die *Gryllus bimaculatus* zu produzieren im Stande ist, beträgt 1 bis 5. Die ersten Gesangsaufnahmen eines Tieres an einem Tag waren immer durch geringe Silbenzahlen gekennzeichnet. Ein- und zweisilbige Chirps wurden aber auch zu Beginn einzelner Strophen erzeugt, wobei selbst in Gesangsaufzeichnungen, in denen Chirps mit hohen Silbenzahlen dominierten, häufig ein- oder zweisilbige Chirps zu erkennen waren. Die minimale Silbenzahl pro Chirp, die ein Individuum an einem Tag erzeugt lag daher für alle ausgewerteten Tiere bei 1.

Die Bestimmung einer mittleren Silbenzahl pro Chirp erscheint Aufgrund der verwendeten Aufnahmetechnik nicht sinnvoll, da zum selben Zeitpunkt immer nur ein Tier aufgenommen werden konnte. Dementsprechend müssen die, in diesem Zusammenhang, aufgenommenen Gesangsspuren als Stichproben angesehen werden. Aus diesen Gründen erschien einzig die Auswertung der maximalen Silbenzahl pro Chirp geeignet, um mögliche Auswirkungen einer Herunterregulierung des NONA-Proteins belegen zu können. Daher wurde für jedes

Einzeltier die maximale Silbenanzahl pro Chirp an jedem Aufnahmetag ermittelt. Anschließend wurden daraus die durchschnittlichen maximalen Silbenanzahlen pro Chirp und Tier den einzelnen Behandlungsgruppen (*nonA*-dsRNA-injizierte Tiere, *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere und unbehandelte Tiere) zugeordnet (s. Abb. 27).

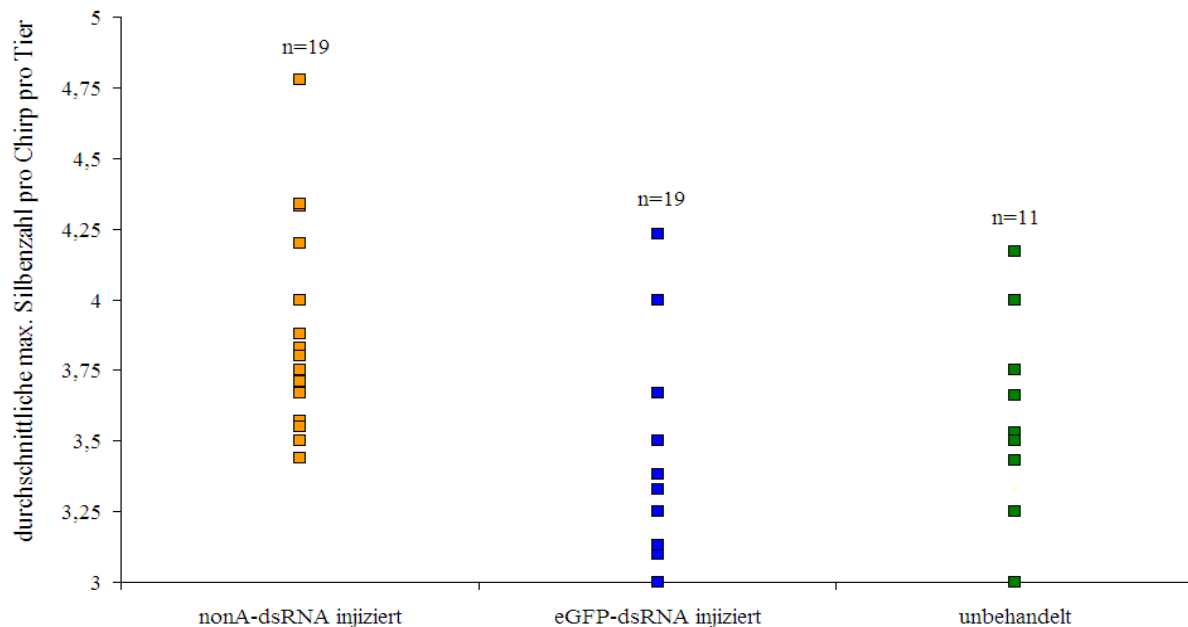


Abbildung 27: Durchschnittliche maximale Silbenzahl pro Chirp und Tier.

NonA-dsRNA-injizierte Tiere (orange), *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere (blau) und unbehandelte Tiere (grün).

Die durchschnittliche maximale Silbenzahl pro Chirp bei *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren erwies sich als signifikant höher als die durchschnittliche maximale Silbenzahl bei *eGFP*-dsRNA-injizierten Tieren (Mann-Whitney Test, $z = -2,789$, $p = 0,005$; nach Bonferoni-Holm-Korrektur signifikant auf 0,05 Niveau) und unbehandelten Tieren (Mann-Whitney Test, $z = -2,750$, $p = 0,006$; nach Bonferoni-Holm-Korrektur signifikant auf 0,05 Niveau). Hingegen unterschied sich die durchschnittliche maximale Silbenzahl pro Chirp bei *eGFP*-dsRNA-injizierten nicht von jener bei unbehandelten Tieren (Mann-Whitney Test, $z = -0,50$, $p = 0,617$).

Tabelle 6 bietet eine Übersicht über die absolute Anzahl ausgewerteter Ereignisse mit maximaler Silbenzahl pro Chirp pro Tag und Individuum. Dabei ist zu beachten, dass für jedes Tier für jeden Tag nur ein Wert (max. Silbenzahl pro Chirp) in die Auswertung bzw. Darstellung eingeschlossen wurde. Dieses Vorgehen ist nötig, um die Auswirkungen zufälliger Erfassung bzw. Nichterfassung von Gesängen möglichst gering zu halten. Das

bedeutet, dass für jedes aufgenommene Maximum zwischen 3 und 19 Tonspuren ausgewertet wurden.

Tabelle 6: Anzahl ausgewerteter Ereignisse mit maximaler Silbenzahl pro Chirp pro Tag und Individuum.

max. Silbenzahl / Chirp	<i>nonA</i> -dsRNA injiziert	<i>eGFP</i> -dsRNA injiziert	unbehandelt
3 Silben / Chirp	29	57	28
4 Silben / Chirp	88	62	38
5 Silben / Chirp	16	3	2

Um die durch die Statistik ermittelten eindeutigen Unterschiede graphisch deutlicher darzustellen, wurden in Abbildung 28 alle ausgewerteten Tonspuren als Einzelmessung (im Gegensatz zu Abbildung 27, in der die Tonspuren pro Individuum gemittelt wurden) aufgetragen.

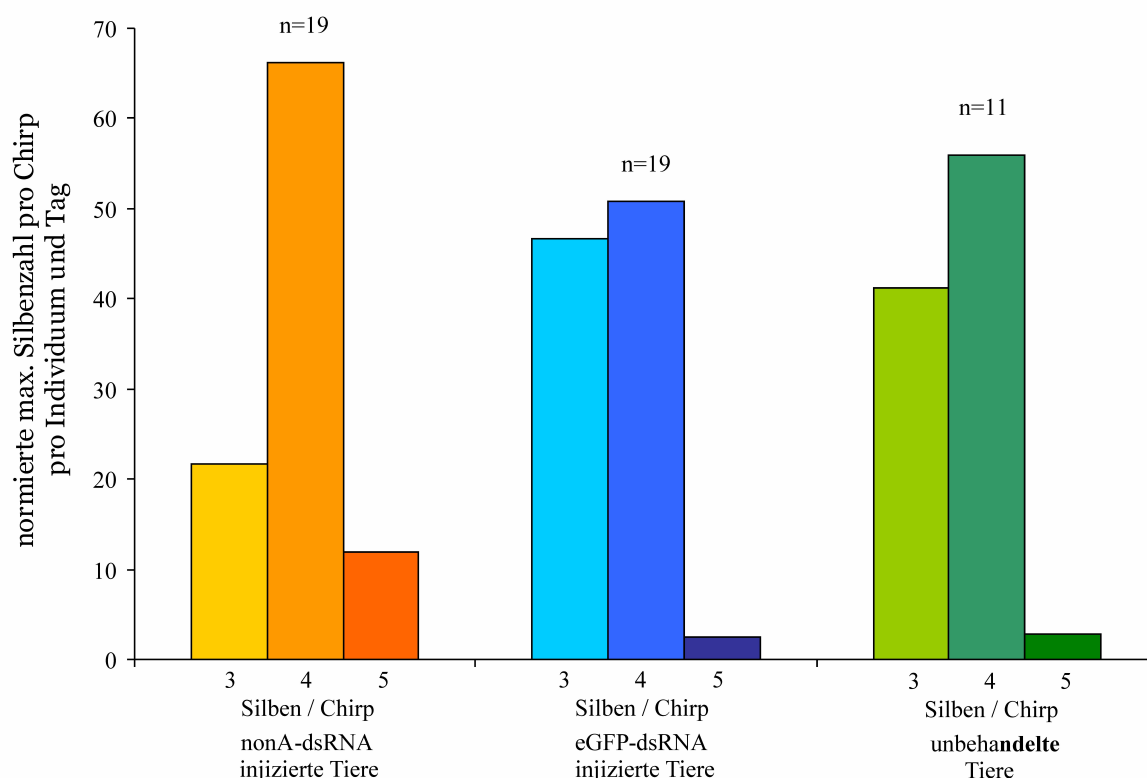


Abbildung 28: Normierte Anzahl ausgewerteter Tonspuren pro Behandlungsgruppe.

NonA-dsRNA-injizierte Tiere (orange), *eGFP*-dsRNA-injizierte Tiere (blau) und unbehandelte Tiere (grün), aufgeteilt in 3, 4 bzw. 5 Silben / Chirp.

Um die Vergleichbarkeit der Behandlungsgruppen zu verbessern, wurden die Daten in Abb. 28 auf die Anzahl von 100 Datenpunkten normiert. Der zugrundeliegende Datensatz ist für beide Darstellungen Abb. 27 und Abb. 28 identisch.

3.5 Rettung von *nonA-Drosophila*-Mutanten durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

Die in den Vektor pCaSpeR-ha-act (s. 2.3) eingefügte Sequenz des *Gryllus bimaculatus nonA*-Gens (s. 5.4) konnte in 3 unabhängige *Drosophila*-Linien integriert werden (s. Tabelle 1 und Anhang 5.6). Der Insertionsort der Linien A & B befindet sich auf dem 3. Chromosom, der Insertionsort der Linie C auf dem 2. Chromosom (s. Tabelle 1).

3.5.1 Molekularer Nachweis von *Gryllus bimaculatus nonA* in *Drosophila melanogaster*

Nach erfolgreicher P-Element-vermittelter Keimbahntransformation und anschließender Kreuzung mit *Drosophila*-Mutanten/-Transformanten konnte nachgewiesen werden, dass die *Gryllus bimaculatus-nonA*-mRNA unter Einfluss des Hitzeschockpromotors HSP70 in *Drosophila melanogaster* exprimiert und translatiert wird.

3.5.1.1 Nachweis von *nonA*-mRNA

Bei *Drosophila melanogaster*-Männchen des Genotyps *T(1;4)9e2-10*; p[211S12-23]; p[*G.b.nonA* A] zeigte sich 2 h nach einem 1 h-Hitzeschock bei 37°C, dass die *Gryllus bimaculatus-nonA*-mRNA problemlos mittels RT-PCR amplifiziert werden konnte (Abb. 29, Spalte 2). (Dieser Genotyp (ohne das *Gryllus bimaculatus*-Konstrukt) repräsentiert eine *Drosophila melanogaster nonA*-Nullmutante, die den Bereich des ersten Exons von *nonA* vollständig abdeckt jedoch so verkürzt ist (endet im 2. Exon), dass kein funktionstüchtiges NONA gebildet werden kann.)

Ebenso problemlos war die Amplifikation der *Gryllus bimaculatus-nonA*-mRNA bei Männchen des Genotyps *T(1;4)9e2-10*; p[*G.b.nonA* C]; p[235R11 SacII] 2 h nach einem 1 h-Hitzeschock bei 37°C (Abb. 29, Spalte 1). (Dieser Genotyp (ohne das *Gryllus bimaculatus*-Konstrukt) repräsentiert eine *Drosophila melanogaster nonA*-Nullmutante, die im Bereich des ersten Exons von *nonA* eine „frame-shift“- Mutation enthält.)

Hingegen war es nicht möglich, ein Produkt aus Fliegen des Genotyps *w¹¹¹⁸* sowie aus dem Wildtyp *Oregon R* zu amplifizieren (Abb. 29, Spalten 3 & 4).

Allerdings gelang es in einem von fünf RT-PCR-Versuchen, aus der homozygoten Linie A (+; +; p[*G.b.nonA* A]/ p[*G.b.nonA* A]) ein Produkt zu amplifizieren (nicht dargestellt, da nur „Mediane“ dargestellt wurden). Damit ist gezeigt, dass es eine (wenn auch geringe) Grundaktivität des Hitzeschockpromotors HSP70 geben muss.

In Abbildung 29 (Spalten 1-5) sind die „Median-Amplifikationen“ dargestellt (jeweils 5 unabhängige RT-PCRs).

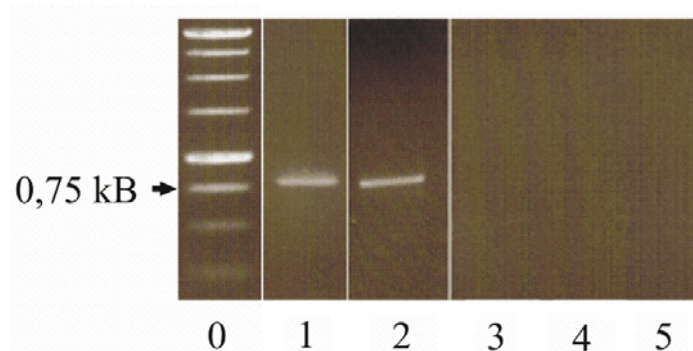


Abbildung 29: qualitativer Nachweis des *Gryllus bimaculatus-nonA*-Transkripts mittels RT-PCR (40 PCR-Zyklen; siehe 5.1:

Primer 51 & 126) in *Drosophila melanogaster*. 0 = DNA-Größenmarker; 1 = *Drosophila melanogaster* ♂ (*T(1;4)9e2-10*; p[*G.b.nonA* C]; p[235R11 SacII]) 2 h nach 1 h Hitzeschock (10-fach verdünnt); 2 = *Drosophila melanogaster* ♂ (*T(1;4)9e2-10*; p[211S12-23]; p[*G.b.nonA* A]) 24 h nach 1 h Hitzeschock (10-fach verdünnt); 3 = *Drosophila melanogaster* ♂ Stamm *Oregon R*; 4 = *Drosophila melanogaster* ♂ Stamm *w¹¹¹⁸*; 5 = *Drosophila melanogaster* ♂ (+; +; p[*G.b.nonA* A] Homozygot) ohne Hitzeschock.

3.5.1.2 Nachweis von NONA-Protein

Die oben beschriebenen Ergebnisse auf Ebene des Transkripts lassen sich ebenso auf Proteinebene nachweisen. Ergänzend konnte festgestellt werden, dass selbst 48 h nach einem 1 h-Hitzeschock *Gryllus bimaculatus*-NONA-Protein in der Transformante *T(1;4)9e2-10*; p[211S12-23] vorhanden war (Abb. 30, Spalte 2). Zudem wurde auch auf Proteinebene die Grundaktivität des Hitzeschockpromotors HSP70 bei 27°C in homozygoten Fliegen des Genotyps +; +; p[*G.b.nonA* A] / p[*G.b.nonA* A] nachgewiesen (Abb. 30, Spalte 5). Die Kontrollen von Tieren des Genotyps *w¹¹¹⁸* sowie von Tieren des Wildtyps *Oregon R* ergaben keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein von *Gryllus bimaculatus*-NONA-Protein (siehe Abbildung 29).

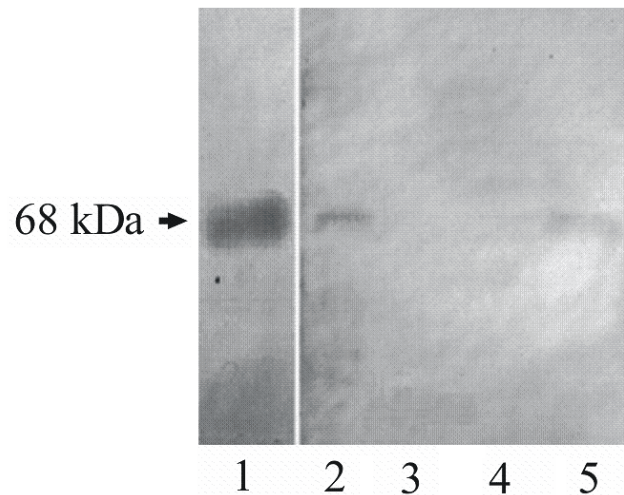


Abbildung 30: semiquantitativer Nachweis des *Gryllus bimaculatus*-NONA-Proteins durch *Gryllus bimaculatus*-NONA-Antikörper in *Drosophila melanogaster*.

1 = *Drosophila melanogaster* ♂ (*T(1;4)9e2-10*; p[*G.b.nonA* C]; p[235R11 *SacII*]) 2 h nach 1 h Hitzeschock; 2 = *Drosophila melanogaster* ♂ (*T(1;4)9e2-10*; p[211S12-23]); p[*G.b.nonA* A]) 48 h nach 1 h Hitzeschock; 3 = *Drosophila melanogaster* ♂ Stamm *Oregon R*; 4 = *Drosophila melanogaster* ♂ Stamm *w¹¹¹⁸*; 5 = *Drosophila melanogaster* ♂ (+; +; p[*G.b.nonA* A] / p[*G.b.nonA* A]) ohne Hitzeschock.

Um zu überprüfen, ob das aus *Gryllus bimaculatus* isolierte Gen in der Lage ist, Funktionen des *nonA*-Gens in *Drosophila melanogaster* zu übernehmen, wurden transgene *Drosophila* „hergestellt“, die verschiedene, das *nonA*-Gen betreffende Mutationen aufwiesen, und zudem mit einer Kopie des vermeintlichen *Gryllus bimaculatus-nonA*-Gens ausgestattet waren.

Interessant ist dabei, dass Nullmutanten des *nonA*-Gens eine deutlich geringere Lebensfähigkeit besitzen als wildtypische Männchen. Des Weiteren sind alle bekannten *nonA*-Mutanten durch Auffälligkeiten im Sehsystem charakterisiert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob das *nonA*-Gen der Grille die Überlebensfähigkeit der männlichen *Drosophila-nonA*-Nullmutanten erhöhen kann, und ob es die Ausprägung der positiven Phototaxis bei *Drosophila*-Mutanten beeinflusst.

3.5.2 Überlebensraten transgener *Drosophila melanogaster*

Der Ausfall des *nonA* Gens in *Drosophila melanogaster* führt zu hemizygot lebensfähigen Fliegen. Da jedoch der prozentuale Anteil an lebensfähigen männlichen Fliegen deutlich reduziert ist, kann man die synthetische Ausfallmutation *nonA⁻* als semiletal bezeichnen (Stanewsky et al. 1993). Daher wurden die Überlebensraten männlicher transgener *Drosophila melanogaster*, die das *Gryllus bimaculatus nonA*-Gen enthalten, untersucht.

Heterozygote $T(1;4)9e2-10/FM7$ bzw. $T(1;4)9e2-10/FM7; [G.b.nonA]$ *Drosophila*-Jungfrauen wurden gegen Männchen gekreuzt, die ein autosomal integriertes P-Element trugen. In der F1-Generation wurden alle geschlüpften Tiere des angestrebten Genotyps gezählt und die Anzahl der Männchen ins Verhältnis zur Anzahl der Weibchen gesetzt, wobei immer 200 Tiere ausgezählt wurden, so dass die Anzahl der Männchen direkt dem prozentualen Erwartungswert entsprach.

Durch die Integration des P-Elements $p[G.b.nonA]$ wurde in allen Transformanten eine höhere Frequenz von lebensfähigen Männchen erzielt, wobei sich die Steigerungsfaktoren zwischen 1,07 und 4,4 bewegten. Ein Steigerungsfaktor von 1 bedeutet keine Steigerung der Überlebensfähigkeit, ein Steigerungsfaktor von <1 bedeutet eine Abnahme der Überlebensfähigkeit, ein Steigerungsfaktor von >1 bedeutet eine Zunahme der Überlebensfähigkeit.

Den geringsten Steigerungsfaktor wiesen die Kontrolltiere (132XhR11A) mit 1,07 auf. (Tiere des Genotyps $T(1;4)9e2-10; +; 132XhR11A$ werden als Kontrolltiere bezeichnet da 132XhR11A den gesamten Bereich von *nonA* vollständig abdeckt. Dementsprechend sollten diese Tiere die gleichen Eigenschaften wie wildtypische *Drosophila melanogaster* besitzen (vgl. Tabelle 1)). Dies ist jedoch kaum verwunderlich, da das Verhältnis von männlichen zu weiblichen ohnehin nahe am natürlichen Verhältnis von ca. 1:1 liegt (siehe Tabelle 6).

Die beiden getesteten 235R11-SacI- Linien (4 bzw. 7) wiesen Steigerungsfaktoren von 1,42 bzw. 1,27 auf. Die mit Abstand größte Steigerung in der Überlebensrate zeigten 211S12A-Tiere mit einem Faktor von 4,4 (siehe Tabelle 6).

Tabelle 7: Überlebensraten transgener *Drosophila melanogaster*: Rettung von $T(1;4)9e2-10$ durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation.

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der geschlüpften männlichen Tiere an, die Zahlen vor der Klammer die Anzahl der Überlebenden nach 7 Tagen.

Transformante	$T(1;4)9e2-10$	$T(1;4)9e2-10;$ $p[G.b.nonA]$	Steigerungsfaktor der Frequenz überlebender männlicher Tiere mit $p[G.b.nonA]$
132XhR11A	98 (98)	105 (105)	1,07
211S12A	5 (20)	22 (34)	4,40
235R11-SacII/4	21 (25)	30 (33)	1,42
235R11-SacII/7	29 (30)	37 (37)	1,27

3.5.3 Test auf positive Phototaxis transgener *Drosophila melanogaster*

Ziel der Tests war es, die positive Phototaxis bereits bekannter Phototaxis-Phänotypen durch die Insertion eines autosomalen P-Elements von *Gryllus bimaculatus* zu beeinflussen.

Dazu wurden *Drosophila melanogaster-nonA*-Mutanten mit Stämmen gekreuzt, die das P-Element p[*G.b.nonA*] von *Gryllus bimaculatus* besitzen. In der F1-Generation wurden alle geschlüpften Tiere des angestrebten Genotyps (wenn erforderlich) selektiert und in der unter Punkt 2.18.1 beschriebenen Phototaxis-Apparatur getestet. Da von den verschiedenen Genotypen unterschiedliche Anzahlen an Individuen für die Tests zur Verfügung standen, wurde (um die Vergleichbarkeit der erhaltenen Werte zu gewährleisten) der durchschnittliche Verhaltensindex pro Individuum bestimmt.

Tabelle 8: Phototaktische Aktivität unterschiedlicher *Drosophila-nonA*-Mutanten.

Genotyp	Anzahl untersuchter Individuen (n)	Verhaltensindex	Verhaltensindex / n
<i>Oregon R</i>	200	712	3,56
<i>T(1;4)9e2-10</i> ; p[132XhR11A]	200	798	3,99
<i>nonA⁻</i>	120	14	0,12
<i>nonA⁻</i> ; p[<i>G.b.nonA</i>]	120	22	0,18
<i>T(1;4)9e2-10</i> ; p[211S12];	10	2	0,2
<i>T(1;4)9e2-10</i> ; p[211S12]; p[<i>G.b.nonA</i>]	60	18	0,3
<i>nonA^{H2}</i>	200	333	1,67
<i>nonA^{H2}</i> ; p[<i>G.b.nonA</i>]	200	408	2,04
<i>nonA^{p14}</i>	200	543	2,72
<i>nonA^{p14}</i> ; p[<i>G.b.nonA</i>]	200	602	3,01
<i>nonA^{p60}</i>	40	118	2,95
<i>nonA^{p60}</i> ; [p[<i>G.b.nonA</i>]]	40	123	3,075

Vergleicht man die phototaktische Aktivität der *Drosophila*-Mutanten mit dem P-Element p[*G.b.nonA*] gegen die jeweiligen Mutanten ohne dieses P-Element, so ergeben sich auf Grundlage des Mann-Whitney-Tests (2-seitig) folgende Signifikanzniveaus:

Der *Oregon R*-Stamm zeigt einen signifikant geringeren Verhaltensindex ($z = -2,2$; $p = 0,027$) als Tiere, die das Gesamtrettungskonstrukt, d.h. ein intaktes *nonA* (p[132XhR11A]) besitzen.

Zwischen der Nullmutanten *nonA*⁻ und der Nullmutanten mit P-Element p[G.b.nonA] ergab sich kein Unterschied ($z = -1,3$; $p = 0,2$).

Ein Vergleich der *nonA*^{H2}-Tiere mit Tieren, die zusätzlich das Grillenkonstrukt *nonA*^{H2}; p[G.b.nonA] exprimieren, zeigte einen signifikanten Unterschied ($z = -2,6$; $p = 0,006$).

Ein Vergleich der *nonA*^{p1}-Tiere mit Tieren, die zusätzlich das P-Element p[G.b.nonA] von *Gryllus bimaculatus* tragen, ergab keinen signifikanten Unterschied ($z = -1,0$; $p = 0,305$) (siehe Tabelle 7 & Abbildung 31). Die statistische Auswertung der Paarungen T(1;4)9e2-10; p[211S12] gegen T(1;4)9e2-10; p[211S12]; p[G.b.nonA] konnte aufgrund einer zu geringen Anzahl lebender männlicher *Drosophilae* nicht durchgeführt werden (vgl. Tabelle 7). Ein statistischer Vergleich der *nonA*^{p60}-Fliegen mit Tieren, in die zusätzlich das P-Element p[G.b.nonA] eingekreuzt worden war, konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden, da sich dieser Stamm während der Kreuzungen als sehr schwach erwies und es immer wieder zur Ausbreitung von Schimmel und damit einhergehenden Totalverlusten in den Kulturen kam (vgl. Tabelle 7).

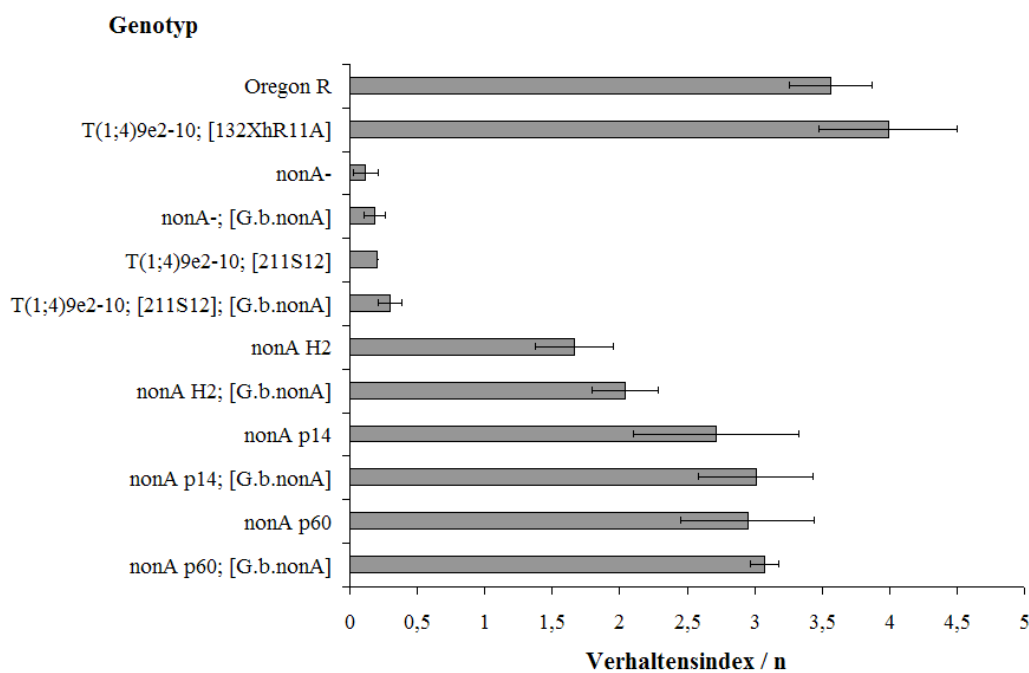


Abbildung 31: normierte phototaktische Aktivität unterschiedlicher *Drosophila nonA*-Mutanten.

4. Diskussion

4.1 Kandidatengene für die akustische Kommunikation in *Gryllus bimaculatus*

Die drei aus *Gryllus bimaculatus* amplifizierten Sequenzabschnitte können mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als Abschnitte orthologer Gene (*cacophony*, *no-on-transientA* und *fruitless*) von *Drosophila melanogaster* angesehen werden. Auf Ebene der Aminosäuresequenz lagen die Übereinstimmungen (inklusive Austausch von AA mit gleichen chemisch-physikalischen Eigenschaften) bei 78-91%. Beim Vergleich mit Zufallssequenzen ergeben sich i.d.R. nur Übereinstimmungswerte von 5-10% (vgl. National Center for Biotechnology Information). Führt man einen Aminosäuresequenzvergleich des *period*-Gens zwischen den Insekten *Apis mellifera* und *Drosophila melanogaster* durch, so erhält man dabei einen Übereinstimmungswert von lediglich 77%. Daraus lässt sich ableiten, dass die gefundenen Sequenzen zumindest auf Proteinebene gut konserviert sind. Zudem besitzen alle drei gefundenen Sequenzen die gleichen funktionellen Domänen, die auch in den orthologen Genen von *Drosophila melanogaster* zu finden sind.

Obwohl die drei Kandidatengene in den jeweils amplifizierten Sequenzabschnitten auf Ebene der Aminosäuren gut konserviert sind, gestaltete sich die Suche nach homologen Sequenzen zu gesangsrelevanten Genen aus *Drosophila melanogaster* in *Gryllus bimaculatus* generell eher schwierig. Zum Einen fehlte es an Ansatzpunkten wie z.B. kurzen Sequenzabschnitten, die als Primer-Bindungsstellen hätten dienen können, zum Anderen findet man keine zwischen zwei oder mehreren Arten konservierten Sequenzabschnitte, aus denen sich degenerierte Primer mit hoher Erfolgswahrscheinlichkeit für *Gryllus bimaculatus* ableiten ließen.

Da alle Versuche, genomische Sequenzabschnitte zu amplifizieren, erfolglos blieben, wurde ausschließlich mit cDNA gearbeitet. Aus diesem Grund können keine Aussagen zur genomischen Struktur der gefundenen Gene gemacht werden. Aufgrund von Untersuchungen an *Gryllus pennsylvanicus* (Petitpierre 1996) ist anzunehmen, dass das Genom von *Gryllus bimaculatus* etwa 10- bis 20-mal größer ist als jenes von *Drosophila melanogaster*, welches mit 176 Mb (= 0,18 pg) angegeben wird (Gregory & Johnston 2008). Daher gestaltet sich die Amplifikation von *Drosophila*-homologen Sequenzen aus der DNA von Grillen (und auch Heuschrecken) deutlich schwieriger als bei vielen anderen Insekten wie *Bombyx mori*, *Tribolium* oder *Apis* (Rasch 1974, Petitpierre 1996).

4.2 RNAi-Applikation im Nervensystem von *Gryllus bimaculatus*

Die Entwicklung einer Methode zur effizienten Herunterregulierung von Genen im Nervensystem adulter *Gryllus bimaculatus* kann bei zukünftigen Fragestellungen zu genetischen Grundlagen von Verhalten von großem Nutzen sein. Obwohl von mehreren Arten aus verschiedenen Ordnungen der Insekten (wie z.B. *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera* und *Schistocerca americana*) bekannt ist, dass die RNAi-Reaktion systemisch wirkt (Tomoyasu & Denell 2004, Dong & Friedrich 2005), stellt die Transfektion von Nervenzellen in lebenden Organismen weiterhin eine besondere Herausforderung dar (siehe auch: Buckingham et al. 2004, Buerli et al. 2007). Der Hauptgrund für die Schwierigkeiten bei der Herunterregulierung von Genen des Nervensystems könnte in der sog. „Hämolymphe-Hirn-Schranke“ zu finden sein. Die Hämolymphe-Hirn-Schranke besteht bei Insekten aus einer semipermeablen Zellschicht von 7-15 µm Dicke, die das Gehirn, die Ganglien und die Konnektive vor direktem Kontakt zur Hämolymphe schützt (Treherne 1985). In dieser Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt, die beste Voraussetzungen für einen RNAi-Effekt im Nervensystem schafft, indem die „Hämolymphe-Hirn-Schranke“ durch Injektion ins Ganglion direkt überwunden wurde. Mögliche negative Auswirkungen auf diese invasive Technik konnten nicht beobachtet werden. Unterdessen muss man jedoch weiterhin bedenken, dass sich nicht jedes Zielgen mit der gleichen Effizienz ausschalten lässt. Vielmehr ist die Dauer und die Stärke des RNAi-Effekts vom Modellorganismus, von den Ziel-Zellen, der angewandten Methode zur Einbringung der dsRNA, von der verwendeten dsRNA-Sequenz sowie vom Zielgen selbst abhängig (McManus et al. 2002; Dong & Friedrich 2005; Turner et al. 2006). Für *Gryllus bimaculatus* können keine genauen Angaben zur Dauer des RNAi-Effekts gemacht werden, da aufgrund der hohen Ausfallraten während der Imaginalhäutung alle überlebenden Tiere für die Gesangsaufnahmen benötigt wurden. Lediglich von 2 Individuen wurden 15 bzw. 20 Tage nach der Imaginalhäutung RT-PCR-Analysen gemacht, die in beiden Fällen für *nonA*-mRNA negativ ausfielen. Sollte dieser Befund in weiteren Studien verifiziert werden, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass in *Gryllus bimaculatus* ein die RNAi aufrechterhaltender Mechanismus existiert. In einigen Pflanzen und Pilzen sowie in *Caenorhabditis elegans* existiert eine RNA abhängige RNA Polymerase (RdRP), die siRNA als Matrize zu deren Vervielfältigung nutzt und so die RNAi über längere Zeiträume aufrecht erhält (Voinnet et al. 1998; Sijen et al. 2001; Ahlquist 2002). Für *Gryllus bimaculatus* scheint es jedoch eher unwahrscheinlich zu sein, dass eine RdRP involviert ist, da bisher weder von *Drosophila* noch von anderen Insekten RdRPs bekannt sind. Bei

Organismen, die nicht über RdRP verfügen, kommt es mit der Neusynthese von mRNA somit zu einer Abschwächung des RNAi-Effekts. Dies bedeutet, dass bei Genen, deren mRNAs und Proteine besonders hohe Turnover-Raten aufweisen, möglicherweise nur über einen sehr kurzen Zeitraum RNAi-Effekte detektiert werden können (Huppi et al. 2005).

Dennoch belegen die Arbeiten von Meyering-Vos (Meyering-Vos et al., 2006; Meyering-Vos & Müller, 2007), dass der RNAi-Effekt in *Gryllus bimaculatus* hochgradig sequenzspezifisch ist, sowie die Arbeiten an Insekten (Yang et al., 2000; Amdam et al. 2003; Maestro & Belles 2006), dass die RNA-Interferenz weiterhin enormes Potential bei der Entschlüsselung von Genfunktionen hat. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit angewandte Methode auch bei anderen Insekten erfolgreich angewandt werden kann, da bisherige Studien sich vielfach darauf beschränkten, Verhaltensgene (insbesondere Gene, die die Tagesrhythmik steuern) zu klonieren und diese biochemisch oder immunozytologisch zu analysieren (Saumann & Reppert 1996; Goto & Denlinger 2002; Lupien et al. 2003; Bembenek et al. 2007). Erst in den letzten beiden Jahren wurden vermehrt RNAi-Studien mit verhaltensrelevanten Genen an Nicht-Modellorganismen wie Lepidopteren (Sandrelli et al. 2007) und Grillen (Moriyama et al. 2008) durchgeführt.

4.3 Molekularer Nachweis von RNAi im Nervensystem von *Gryllus bimaculatus*

Der molekulare Nachweis von RNAi im Nervensystem von *Gryllus bimaculatus* erbrachte, dass es sowohl auf der Ebene der RNA wie auch auf Proteinebene zu einer deutlichen Verringerung an entsprechendem Produkt kommt. Wie bereits mehrfach angedeutet, erwartet man bei der Anwendung von RNAi eine relativ hohe Varianz des eintretenden Effekts. Es ist daher umso bemerkenswerter, dass bei allen Tieren, die als Subadulti mit *nonA*-dsRNA injiziert worden waren, weder *nonA*-mRNA noch NONA-Protein nachgewiesen werden konnte. Da auch Tiere, denen als Adulti *nonA*-dsRNA injiziert wurde, eine deutliche Reduktion von *nonA*-mRNA und NONA-Protein aufwiesen, ist davon auszugehen, dass durch größere Stichproben auch hier signifikante Verhaltenseffekte zu beobachten wären.

4.4 Verhaltensänderungen bei *Gryllus bimaculatus* nach *nonA*-dsRNA Injektion

4.4.1 Auswirkungen auf die Silbenperiode

Um spezifische Verhaltensänderungen von *Gryllus bimaculatus* nach der Injektion von *nonA*-dsRNA ins Metathorakalganglion zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter des Lockgesangs der männlichen Grillen analysiert. Ein wichtiger Parameter der Lockgesänge ist die Silben-Periodenlänge, also die Einheit aus einer Silbe und der darauf folgenden Pause. Da aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Deckflügel die Silbenlänge bei *Gryllus bimaculatus* nahezu temperaturunabhängig ist (Doherty 1985), müssen die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede in der Periodenlänge ausschließlich durch die Pausen zwischen den Silben entstehen. Diese Interpretation der Silbenlänge wird auch durch Arbeiten an anderen zirpenden Grillenarten unterstützt, in denen Stridulationsbewegung und Elektromyogramme während der Stridulation aufgezeichnete wurden (Kutsch 1969). Dennoch war es für die Auswertung sinnvoll, nicht die Pausenlängen direkt, sondern die Silben-Periodenlängen miteinander zu vergleichen, da der Übergang von Silben zu Pausen bei der Verwendung einer Detektionsschwelle aufgrund von Rauschen teilweise nur sehr ungenau erfasst werden kann. Verwendet man die Detektionsschwelle hingegen, um die Silbenperiode zu erfassen, können selbst stark verrauschte Gesänge ausgewertet werden, da die Silbenperiode stets durch zwei nahezu parallele Anstiege markiert wird und man daher durch ein Heraufsetzen der Detektionsschwelle nicht Gefahr läuft, die Pause zu überschätzen (siehe Abbildung 32).

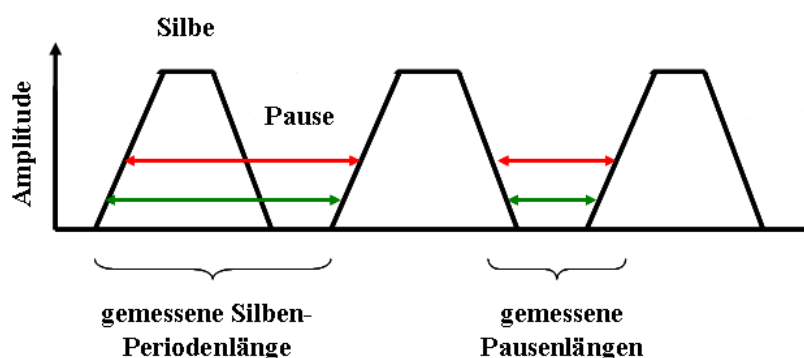


Abbildung 32: Vergleich der beiden Auswertungs-möglichkeiten:

Silben-periodenlänge im Vergleich zur Pausenlänge auf zwei unterschiedlichen Detektionsniveaus (rot bzw. grün).

Die Periodenlänge ist bei *Gryllus bimaculatus* negativ mit der Temperatur korreliert. Die Messungen in dieser Arbeit ergaben für die Periodenlänge Werte zwischen 48 ms bei 21°C

und 29,75 ms bei 30,8°C. Bei 25°C ergeben sich für die Periodenlänge Werte um die 40 ms. Diese Beobachtung stimmt mit dem von Zhantiev 1981 ermittelten Wert von 40,4 ms Periodenlänge bei 25°C überein. Doherty (1985) hat festgestellt, dass die Silbenrate ebenso wie die Chirprate im Lockgesang von *Gryllus bimaculatus* nur bis ca. 24°C temperaturabhängig linear ansteigt, bei Temperaturen über 24°C bis mindestens 33°C jedoch konstant bleibt. Ähnliche Beobachtungen zum temperaturabhängigen Gesangsverhalten wurden auch bei *Gryllus pennsylvanicus*, *Gryllus campestris* und *Gryllus firmus* gemacht (Alexander 1957; Kutsch 1969; Pires & Hoy 1992). Verknüpft man die Beobachtungen von Doherty (1985) mit den Ergebnissen dieser Arbeit, so müsste man annehmen, dass die Pausen zwischen den Chirps mit steigender Temperatur größer werden, damit bei sinkender Silbenperiodenlänge die Chirpfrequenz konstant bleibt. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Werte kann diese Vermutung weder bestätigt noch verworfen werden. Zum Einen, weil der Temperaturrahmen, in den über 90% aller aufgenommenen Werte fallen, zwischen 23 und 29°C liegt und somit die Extreme aus Doherty (1985) von 15-20°C und über 30°C kaum erreicht werden. Zum Anderen weil sich die Standardabweichungen bei Interchirp-Pausen im selben Tier oft in Bereichen von 30-70 ms (entspricht ca. 15-30% des Interchirp-Pausenwertes) bewegen und somit selbst die ermittelten Maximalunterschiede in der Chirpdauer verschiedener Individuen von ca. 50 ms maskieren. Es erscheint zudem diskussionswürdig, ob Temperaturbereiche von unter 20°C und über 30°C in die natürliche Temperaturspanne fallen, in der Lockgesänge generiert werden. Obwohl während mehrerer Versuchsperioden mehrere Stunden Temperaturen von unter 20°C registriert wurden, konnte unter 20°C kein auswertbarer Gesang aufgenommen werden. Für Temperaturen von über 30°C wurden zwar Gesänge aufgezeichnet, jedoch sollten Werte von über 30°C eine Stunde nach Sonnenuntergang (der bevorzugten Aktivitätszeit von *Gryllus bimaculatus*) selbst im Mittelmeerraum eher die Ausnahme darstellen. Zudem kann vermutet werden, dass bei Annäherung an Maximaltemperaturen endogene physiologische Grenzen erreicht werden, die einer Chirpfrequenz-Erhöhung entgegenwirken. Es ist also anzunehmen, dass einerseits aufgrund der engeren Temperaturspanne der in dieser Arbeit aufgenommenen Lockgesänge die Plateau-Bildung bei hohen Temperaturen maskiert wurde, und andererseits die negative Korrelation von Silbenperiode und Temperatur in der Arbeit von Doherty (1985) durch die große Varianz der Interchirp-Pausenlängen überdeckt wurde. Bei den ebenfalls zirpenden Grillenarten *Gryllus vernalis*, *Gryllus fultoni* und *Gryllus integer* konnte hingegen kein Hinweis auf einen nicht-linearen Zusammenhang zwischen der Temperatur und Silben- bzw. Pulsrate entdeckt werden (Hedrick et al. 2002; Jang & Gerhardt 2007). Hedrick et al. (2002)

stellten zudem fest, dass bei *Gryllus integer* die Silbenperiodenlänge negativ linear mit der Temperatur korreliert ist und diese Korrelation auch bei der Interchirp-Pausenlänge zu beobachten ist. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Silbenperiodenlänge des Lockgesanges von *Gryllus bimaculatus* in physiologisch relevanten Temperaturbereichen negativ linear mit der Temperatur korreliert.

Durch die Injektion von *nonA*-dsRNA konnten keine Veränderungen der Silbenperiodenlänge in Abhängigkeit zur Temperatur beobachtet werden. Die Ausgleichsgeraden von unbehandelten, *eGFP*-dsRNA-injizierten und *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren unterschieden sich nicht voneinander. Obwohl dieses Ergebnis nicht überrascht, ist es wichtig für das Verständnis möglicher anderer Veränderungen von Gesangsparametern, da gezeigt wurde, dass keinerlei schwerwiegende Störungen in der Gesangsgenese durch die direkte Injektion ins Nervensystem hervorgerufen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Temperatur-Kopplung von Sender und Empfänger (siehe hierzu: Skovmand & Pedersen 1983; Gerhardt 1978, Ritchie et al. 2001; Walker & Cade 2003; Beckers & Schul 2008) durch die direkte Injektion von *nonA*-dsRNA ins Nervensystem der Grille nicht beeinflusst wird.

Erstaunlich sind in diesem Zusammenhang allerdings die zum Teil signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Temperaturabhängigkeit der Silbenperiode zwischen den Individuen einer Behandlungsgruppe (s. Abb. 24). Sollte es diese individuellen Unterschiede nicht ebenso bei der Präferenz der Weibchen geben, könnte dies ein Hinweis auf ein mögliches Auswahlkriterium im Rahmen der sexuellen Selektion sein. Die zum Teil signifikanten Unterschiede zwischen den Individuen einer Behandlungsgruppe heben sich im Vergleich verschiedener Behandlungsgruppen allerdings vollständig auf.

4.4.2 Auswirkungen auf die maximale Silbenzahl pro Chirp

Ein weiterer wichtiger Parameter des Lockgesangs bei Grillen ist die Anzahl von Silben, die einen Chirp bilden (Hedrick & Weber 1998). Bei *Gryllus bimaculatus* variiert die Anzahl von Silben in einem Chirp zwischen 3 und 5 Silben, wobei 3- und 4-silbige Chirps die Regel darstellen und 5-silbige Chirps nur selten generiert werden. Eine Temperaturabhängigkeit der Silbenzahl pro Chirp konnte nicht festgestellt werden; diese Beobachtung wird durch die Arbeit von Hedrick et al. (2002) an *Gryllus integer* unterstützt. Die Erhöhung der Silbenzahl pro Chirp hat keinen Einfluss auf die Länge der Silbenperiode, wirkt sich folglich aber auf die Länge der Chirps aus (Ozerskii & Shchekanov 2001). Auch die Länge der Interchirp-Pausen ist bei Lockgesängen mit höherer Silbenzahl pro Chirp größer (Ozerskii & Shchekanov 2001).

NonA-dsRNA injizierte *Gryllus bimaculatus* generierten signifikant häufiger Chirps mit 4 und 5 Silben als die Tiere aus den Vergleichsgruppen *eGFP*-dsRNA-injizierter bzw. unbehandelter Tiere. Besonders selten zeigten die *nonA*-dsRNA-injizierten Tiere reine 3-silbige Gesänge. Die Anzahl der Gesänge mit max. 3-silbigen Chirps lag bei den Kontrollgruppen mit 47 bzw. 41% etwa doppelt so hoch wie bei den *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren. Die Anzahl von Gesängen, in denen 4-silbige Chirps auftauchten, war bei den *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen leicht erhöht, die Anzahl der Gesänge, in denen 5-silbige Chirps generiert wurden, war jedoch mit ca. 12% etwa 4-6 mal größer als bei den Kontrollgruppen (unbehandelte bzw. *eGFP*-dsRNA injizierte Tiere).

Die Herunterregulierung des *nonA*-Gens durch RNAi führt somit zu einer Verschiebung des Gesangsverhaltens innerhalb der natürlichen Norm. Dieses Ergebnis ist umso bemerkenswerter, wenn man bedenkt, dass der Effekt der RNAi nicht zu einem diskreten Phänotypen führt, sondern zu einer Bandbreite unterschiedlich stark ausgeprägter Phänotypen. Interessanterweise beschreiben Campesan et al. (2001) bei *Drosophila melanogaster* den Phänotypen einer *nonA*-Mutante, deren Gesang polyzyklischer als im Wildtyp ist und damit dem der nahe verwandten Art *Drosophila virilis* gleicht. Wenngleich man den RNAi-Phänotypen von *Gryllus bimaculatus* nicht mit dem einer Entwicklungsmutante von *Drosophila melanogaster* vergleichen kann, so ist dies dennoch ein sehr interessanter Aspekt, der möglicherweise Hinweise auf eine zwischen diesen beiden Arten konservierte Funktion des *nonA*-Gens geben kann.

4.4.3 Auswirkungen auf die tageszeitliche Gesangsaktivität

Bei vielen Tierarten unterliegt die Steuerung von Verhalten molekularen Prozessen, die einen zirkadianen Rhythmus aufweisen. Dies gilt für Vertebraten (Shaw et al. 1993; Lu et al. 1995; Cahill & Besharse 1995) ebenso wie für Invertebraten wie Insekten (Horridge et al. 1981; Fleissner 1982; Tomioka & Chiba 1982; Chen et al. 1999; Giebultowicz 2000; Giebultowicz et al. 2000) und Crustaceen (Bryceson 1986; Arikawa et al. 1987). Das zirkadiane System wird i.d.R. durch visuelle Reize (Licht & Dunkelheit) feinjustiert, wird aber auch bei fehlenden äußeren Einflüssen vollkommen autonom beibehalten, wobei der Tagesrhythmus in diesem Fall oftmals nicht genau 24h beträgt. Eine Vielzahl physiologischer Prozesse wird durch eine endogene Rhythmik gesteuert, so z.B. Bewegungsaktivität (Tomioka & Chiba 1984, Tomioka et al. 1998), Häutung (Pittendrigh et al. 1958) und auch Stridulation (Loher 1962). Die innere Bereitschaft eines Tieres, ein bestimmtes Verhalten zu zeigen, kann aufgrund zirkadianer Expression von Neuromodulatoren oder Neurotransmittern im Laufe

eines Tages stark variieren (Gaus et al. 1997; Meinertzhagen & Pyza 1999; Saifullah & Tomioka 2002). Obwohl der Ursprung der zirkadianen Rhythmik im Nervensystem vieler Arten noch nicht genau lokalisiert werden konnte, ist anzunehmen, dass die „innere Uhr“ artübergreifend der efferenten Kontrolle eines endogenen Schrittmachers, der sich in diskreten Bereichen des zentralen Nervensystems befindet, unterliegt (Helfrich-Förster 2004). Für *Gryllus bimaculatus* konnten die Lamina und die äußere Medulla in den optischen Loben als Ursprungsort der zirkadianen Rhythmik identifiziert werden (Tomioka & Chiba 1982, 1984, 1992; Tomioka & Abdelsalam 2004).

Auch der Lockgesang von *Gryllus bimaculatus* unterliegt einer zirkadianen Rhythmik, die Hauptgesangsaktivität ist in den ersten Stunden unmittelbar nach Sonnenuntergang bzw. nach Erlöschen des Lichts zu beobachten (Nakatani et al. 1994, diese Arbeit).

Nach Aufteilung des Tages in 4 Quartale (zwei Nachtquartale und zwei Tagquartale zu je 6 Stunden) ergab sich, dass die Tiere signifikant häufiger im ersten Nachtquartal singen als in jedem anderen Quartal. Zwischen den beiden Tagquartalen und dem zweiten Nachtquartal konnten keine Unterschiede in der Gesangsaktivität der Grillen festgestellt werden.

Obwohl zwischen den drei Vergleichsgruppen (unbehandelte Tiere, *eGFP*-dsRNA injizierte, *nonA*-dsRNA injizierte Tiere) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, zeigte sich ein Trend in Richtung einer weniger stark ausgeprägten zirkadianen Rhythmik bei den *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren. Im gesamten Tagesverlauf liegt die Gesangsaktivität von *nonA*-dsRNA-injizierten Tieren leicht über der der Vergleichsgruppen; lediglich im ersten Nachtquartal ist das Verhältnis umgekehrt, während das zweite Nachtquartal keinen Trend zeigt.

Möglicherweise wurde ein signifikanter Effekt durch eine nicht ausreichende akustische Isolierung der Versuchstiere verdeckt. Während jedes Aufnahmedurchgangs wurden Tiere aller drei Vergleichsgruppen parallel getestet. Dadurch ist nicht auszuschließen, dass Stridulationsgeräusche die Motivation nicht stridulierender Tiere positiv beeinflusst haben. Dies würde den vermuteten Effekt in beide Richtungen abschwächen: einerseits würden Tiere der Kontrollgruppen durch vermehrt tagsüber zirpende *nonA*-dsRNA-injizierte Tiere motiviert, andererseits würden die Tiere der Kontrollgruppen im ersten Nachtquartal die *nonA*-dsRNA-injizierten Tiere demotivieren. Die These der gegenseitigen Motivation bzw. Demotivation wird durch die Beobachtung, dass die meisten der aufgezeichneten Gesangsereignisse zeitlich gebündelt auftraten, unterstützt.

Geht man von einem verdeckten Effekt aus, könnte man einen Einfluss des *nonA*-Gens auf die zirkadiane Rhythmik bzw. das damit verknüpfte visuelle System vermuten, da bei

Drosophila melanogaster gezeigt werden konnte, dass den Gesang betreffende Mutationen in der kodierenden Region des *nonA*-Gens gleichzeitig immer auch das Sehvermögen beeinflussen (Rendahl et al. 1992 und 1996, Stanewsky et al. 1996).

4.5 Rettung der *Drosophila melanogaster nonA*-Nullmutante mit dem *nonA*-homologen Gen aus *Gryllus bimaculatus*

4.5.1 Überlebensfähigkeit transgener *Drosophila melanogaster*

Der Ausfall des *nonA* Gens in *Drosophila melanogaster* führt zu hemizygot lebensfähigen Fliegen. Da jedoch der prozentuale Anteil an lebensfähigen männlichen Fliegen deutlich reduziert ist, kann man die synthetische Ausfallmutation *nonA*- als semiletal bezeichnen (Stanewsky et al. 1993). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit das *nonA*-Kandidatengen aus *Gryllus bimaculatus* Einfluss auf die Überlebensfähigkeit verschiedener synthetischer *Drosophila nonA*--Mutanten hat. Alle drei getesteten Transformanten-Stämme zeigten erhöhte Überlebensraten, wenn zusätzlich das Grillengen im Genom integriert war. Die beiden *nonA*--Stämme (T(1;4)9e2-10; p[G.b.*nonA* C]; p[235R11 *SacII*/4] und T(1;4)9e2-10; p[G.b.*nonA* C]; p[235R11 *SacII*/7]) zeigten um den Faktor 1,42 bzw. 1,27 erhöhte Überlebensraten gegenüber den *nonA*--Stämmen ohne *Gryllus bimaculatus*-Konstrukt (T(1;4)9e2-10; +; p[235R11 *SacII*/4] und T(1;4)9e2-10; +; p[235R11 *SacII*/7]). Diese Steigerungen sind eher moderat und in Anbetracht der (trotz Steigerungen) in allen Stämmen geringen Überlebensrate (der männlichen Fliegen) von 21-37% schwer interpretierbar. Anders verhält es sich beim Vergleich der Transformanten des Genotyps T(1;4)9e2-10; p[211S12-23]; p[G.b.*nonA* A] mit den Transformanten ohne *Gryllus bimaculatus*-Konstrukt (T(1;4)9e2-10; p[211S12-23]; +). Hier konnte durch das *Gryllus bimaculatus*-Konstrukt die Überlebensrate der männlichen Fliegen von 5% auf 22% erhöht werden, was einem Steigerungsfaktor von 4,4 entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, dass das orthologe *nonA*-Gen aus *Gryllus bimaculatus* zumindest teilweise Funktionen des Gens in/von *Drosophila melanogaster* übernehmen kann. Die beachtlichen Unterschiede in Bezug auf die Steigerung der Überlebensfähigkeit der männlichen Fliegen lassen sich möglicherweise durch Positionseffekte erklären. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die *nonA*-Nullmutanten decken sich weitgehend mit den Angaben von Stanewsky et al. (2003). Die Unterschiede, die bei der Überlebensrate der männlichen Fliegen zwischen den Nullmutanten 211S12-23 und 235R11 *SacII* beobachtet wurden, können möglicherweise mit Positionseffekten erklärt werden. Sie könnten allerdings auch in Zusammenhang mit der verwendeten

Konstruktsequenz von 211S12-23 stehen, da diese nahe einer für das stromaufwärts befindliche Gpi1-Gen (Synonyme: l(1)i19e, l(1)14Ca, flybase: CG32578) essentiellen Region endet (Jones & Rubin 1990; Stanewsky et al. 1993).

Interessanterweise ist der Effekt der Rettung durch das Grillenkonstrukt bei den 211S12-23-Transformanten ausgeprägter als bei den 235R11 SacII-Transformanten. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Aminosäuresequenz des *nonA*-orthologen Grillengens, so fällt auf, dass sie im Vergleich zum *Drosophila melanogaster-nonA* in der 5'-Region modifiziert (verkürzt) vorliegt. Das Konstrukt 211S12-23 deckt diesen Bereich vollständig ab, wohingegen sich in den 235R11 SacII-Konstrukten eine „frame shift“-Mutation im ersten Exon befindet.

Die Raten der überlebenden fertilen männlichen Fliegen gleichen sich bei den *nonA*-Mutanten nach Transformation mit dem Grillenkonstrukt deutlich aneinander an. Dies könnte ein Indiz für einen allgemeinen kompensatorischen Mechanismus sein.

Die mit dem Grillenkonstrukt transformierten überlebenden männlichen Fliegen zeigten ebenfalls die von Stanewsky et al. (1993) beschriebenen motorischen Defizite: sie waren flugunfähig und ihre Bewegungen erschienen unkoordiniert und träge.

4.5.2 Test auf positive Phototaxis transgener *Drosophila melanogaster*

Da bekannt ist, dass die meisten *nonA*-Mutationen in *Drosophila melanogaster* Phänotypen mit visuellen Defiziten erzeugen, wurde in Phototaxisversuchen untersucht, ob das orthologe Grillengen die Funktion des mutierten Gens kompensieren kann. Dazu wurden die *Drosophila*-Stämme Oregon R, *T(1;4)9e2-10; p[132XhR11A]*, *nonA⁻*, *T(1;4)9e2-10; p[211S12-23]*, *nonA^{H2}*, *nonA^{p14}*, *nonA^{p60}* gegen die jeweiligen transformanten Linien mit eingekreuztem Grillen-*nonA* getestet. In allen Gruppen konnte bei Tieren mit dem *nonA*-Konstrukt aus *Gryllus bimaculatus* ein minimal bis leicht (4% bis 22% Steigerung) erhöhtes phototaktisches Verhalten beobachtet werden. Die Ergebnisse der beiden Nullmutanten *T(1;4)9e2-10; p[235R11 SacII/7]* und *T(1;4)9e2-10; p[211S12-23]* mit ihren jeweiligen Grillen-Transformanten sind aufgrund der zu geringen Individuenzahl nicht aussagekräftig. Die prozentualen Verbesserungen im Verhaltensindex lagen bei den mit *Gryllus bimaculatus-nonA* transformierten Punktmutationen für *nonA^{p60}* bei 4%, für *nonA^{p14}* bei 11% und für *nonA^{H2}* bei 22%. Diese Daten untermauern die These, dass das *nonA*-Gen aus *Gryllus bimaculatus* zwar nicht in der Lage ist, die Funktion des *nonA*-Gens in *Drosophila melanogaster* vollständig zu übernehmen, dass es aber durchaus in Prozesse mit eingebunden

ist, die den entsprechenden *nonA*-Phänotyp abmildern. Man kann also durchaus von einer zumindest teilweisen funktionellen Konservierung des *nonA*-Gens zwischen *Gryllus bimaculatus* und *Drosophila melanogaster* ausgehen, die seit mindestens 300 Millionen Jahren, also seit der Aufspaltung der Neoptera, bestehen muss.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine gut replizierbare RNA-Interferenz-Methode entwickelt, die es ermöglichte, einige spezifische verhaltensrelevante Eigenschaften eines Orthologs des *no-on-transientA*-Gens (*nonA*) in *Gryllus bimaculatus* zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser Methode sollte es in Zukunft möglich sein, auch andere vielversprechende Verhaltensgene bei Grillen zu untersuchen.

Ein möglicher Ansatz, um den Einfluss einer Herunterregulierung des *nonA*-Gens auf die zirkadiane Gesangsaktivität genauer zu untersuchen, wäre die Untersuchung der Sehfähigkeit der behandelten Tiere, da von *Drosophila-nonA*-Mutanten bekannt ist, dass durch die Mutation verschiedene Parameter des Sehens beeinträchtigt sein können. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Elektroretinogrammen (ERG), bei denen auf primärer Verarbeitungsebene die on- und off- transienten Spikes als Antwort auf Lichtreize gemessen werden können. Auf Verhaltensebene wären Versuche auf der Kramer-Kugel möglich, wobei eine veränderte Ausprägung des phototaktischen Verhaltens *nonA*-dsRNA-injizierter Tiere gegenüber dem Wildtyp denkbar ist. Sollte aufgrund derartiger Experimente ausgeschlossen werden können, dass die Grillen durch die Herunterregulierung des *nonA*-Gens erblinden und sich die zirkadiane Rhythmik der Gesangsaktivität dadurch verschiebt, wären weitere Experimente zur Gesangsaktivität (unter vollständiger akustischer Isolation der Individuen voneinander) sowie Versuche zur Bewegungsaktivität sinnvoll.

Da weibliche *Gryllus bimaculatus* ohnehin männliche Tiere bevorzugen, die Chirps mit einer erhöhten Anzahl von Silben produzieren, sind Versuche mit *nonA*-dsRNA-injizierten Weibchen zur Präferenz von Chirps mit erhöhter Silbenzahl nicht sinnvoll. Möglicherweise könnte man jedoch mit Hilfe der Kramer-Kugel untersuchen, ob eine Injektion von *nonA*-dsRNA die Motivation von Weibchen verändert, in Richtung eines durchschnittlichen Reizes (bzgl. Silben pro Chirp) zu laufen. Über einen derartigen Versuch ließen sich evt. Rückschlüsse ziehen, ob die Herunterregulierung des *nonA*-Gens zu einer gleichartigen Verschiebung des Verhaltens bei Sender und Empfänger führt.

5. Anhang

5.1 Nukleotidsequenzen verwendeter Primer

Tabelle 10: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer.

Nr.	Name	Oligonukleotid Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
1	5'sid1 deg.	CAYACCCGCCAYCCTGAYATHAAYGC	Sequenzsuche
2	3'sid1 deg.	CCANCGACCCATRTARTADATYTG	Sequenzsuche
3	Sid-1, 5'	TGCATGCTAAAGATATACCAGACCCGCC A	Sequenzsuche
4	Sid-1, 3'	ACAGCAATGGTTGCACCAGTATGCGCTC	Sequenzsuche
5	Fru 3' zinc finger1	AGGTGACCAACCGATGGCACCA	Sequenzsuche
6	Fru 3' zinc finger2	TGTGGGAAGGAGGTGACCAACCGATGG CA	Sequenzsuche
7	BTB 5' primer	AGCTCATCAGACAATCTTGTGAGCCTGT AG	Sequenzsuche
8	NonA 3' 1831	TTCCACCAAATAAACGACCCTG	Sequenzsuche
9	NonA 5' 1	ATATTGTGCTGGAGATTTTTTAAGTGTT ACAGTATTTTCGTTTCG	Sequenzsuche
10	Cac 3' 1168 +5	TGAGCAAGCTTATCACATGGTCTGCC	Sequenzsuche
11	Cac 3' 1212 +5	AGGCGTATGCTAGGTTGGAGCCACA	Sequenzsuche
12	Cac 5'	CGGTTACCAAAGAGGATTGCCAGGGTC	Sequenzsuche
13	ebony 5' 1	TCTTGCCCCATATATGATGCCAGAGG	Sequenzsuche
14	ebony 5' 2 (nested)	TGCTTGTGAATGGCAAGACAGACAGGCA GC	Sequenzsuche
15	ebony 3' 1	AGACAGCCCTTTGCCAGTCAGGAGC	Sequenzsuche
16	black 5' 1	ACTGGTGACAAAAGTGTGCAGTGTG	Sequenzsuche
17	black 3' 1 (nested)	TGGCTGGTAACTGATCATCACAGC	Sequenzsuche
18	black 3' 2 nonA T7	TCCATATCTTGGTGTGTTGGTGGAGG	Sequenzsuche
19	GSP 5'for	TCAGACATAATGTGCTGTTGCTGGCGTG	Sequenzsuche
20	GSP 3'for nest	CAGGTGCAGACCCAATGAAGACGTAC	Sequenzsuche
21	GSP 3'for	ACAGCTTGTGTAGTGGAGGCCTTTGAC	Sequenzsuche
22	for 5' 2975	GTTGGAGGTTTTGGAAGAGTNGARTTNG	Sequenzsuche
23	for 5' 3312	ATCTATCGTGATCTGAAACCTGARAAYCT NC	Sequenzsuche
24	for 3' 3662	TTGGTAACCAAGTCTCTCAGCNGGRTR TC	Sequenzsuche
25	for 3' 3707	GAAGCCATCAAACCACTTGTGCTTYTGD	Sequenzsuche

		ATYTC	
26	cac T7 5'	TAATACGACTCACTATAGGGCTGCTGAA GAGGAACAG	Sequenzsuche
27	Cac 3' 1168 +5	TGAGCAAGCTTATCACATGGTCTGCC	Sequenzsuche
28	Cac 3' 1212 +5	AGGCGTATGCTAGGTTGGAGCCACA	Sequenzsuche
29	Cac 5'	CGGTTACCAAAGAGGATTGCCAGGGTC	Sequenzsuche
30	3' GSP cac2 PCR	TGCGACAGGTGAAGCTTGGCCGTC	Sequenzsuche
31	3' GSP cac2 nested PCR	TGCATCAGTGGCGCTCCTTG	Sequenzsuche
32	3' GSP cac2 RT	TGTGCAATCCTTCAAGGCGCTG	Sequenzsuche
33	5' GSP for RT	GGCTATGCAAATAGTCAAAGGCCTCCAC	Sequenzsuche
34	5' GSP fru RT	ACTTTCGAAGTATGGACTACAGGCTGAC	Sequenzsuche
35	5' GSP fru PCR	CTTTCGAAGTATGGACTACAGGCTGACA AG	Sequenzsuche
36	GSP 5'fru	TCTTGTCAGCCTGTAGTCCATACTTC	Sequenzsuche
37	GSP 5'fru nest	ATTTTCCTTAGAGATGTGAATTATGTAG	Sequenzsuche
38	GSP 3'fru	CTAAGGAAAATAATAGGATGTGGATGAG	Sequenzsuche
39	GSP 3'fru nest	GGACTACAGGCTGACAAGATTGTCTGA	Sequenzsuche
40	GSP 3'cac	GACAGGAAGTAAAGCAGGGCAGAATC	Sequenzsuche
41	GSP 3'cac nest	CTCTGCGAGTGTTGCGAGTGTTGA	Sequenzsuche
42	GSP 5'cac	CCATCTCTTTCTCCAGCTCCTGTTG	Sequenzsuche
43	GSP 5'cac nest	TGTTCCCTCTTCAGCAGCTGTCAGTTC	Sequenzsuche
44	GSP 3'nonA	GCTCGGGAGGTTGGTCCTAGATTTGCTA	Sequenzsuche
45	GSP 5'nonA	CCTCCATTGACTTCCCCCTCTCATC	Sequenzsuche
46	nonA 5' exact 1- >23	CGTGATGAAAGAGGCATGCGGTC	Sequenzsuche
47	nonA 3' exact 1200<-1227	ATCGTAGCGTCCAGCTCCACGGTCGTAC	Sequenzsuche
48	5. per 1860 3'	AGGAGTTTCTGTBGACGAYTTGCTNTC	Sequenzsuche
49	6. per 1860 5'	GACAGCAAGTCGTCAACNGARACNCC	Sequenzsuche
50	7. nonA 3'	GTCGCAAAGACGCTGTCAGAAAGAAGC	Sequenzsuche
51	8. nonA 5'	GCTTCTTTCTGACAGCGTCTTTGCGAC	Sequenzsuche
52	9. fru 3'	CTACAGGCTGACAAGATTGTCTGATGAG C	Sequenzsuche
53	10. fru 5'	GCTCATCAGACAATCTTGTCAGCCTGTA G	Sequenzsuche
54	nonA 5' RT 5' , 353<-374	TGTTGATACGACCACCTCCACG	Sequenzsuche
55	nonA 5' PCR 5' ,	AGAATTCTGCCCAGGTTGCTCCTGGGGT	Sequenzsuche

	142<-163	C	
56	cac 5' RT, 344<-363	CCCATTAGCTGCAGGGCTTC	Sequenzsuche
57	cac 5' PCR, 255<-280	AGCTGTCAGTTCCTGCGCATTGGCCAAGT	Sequenzsuche
58	GSP 5'nonA	ACTACAGGTCGCAAAGACGCTGTC	Sequenzsuche
59	Per1: 1.1.05 peri	CATCATGACTATTACGACAGC	Sequenzsuche
60	Per2: 1.1.05 bla	TACGACAGCAAATCGTCAACG	Sequenzsuche
61	Per3: 1.1.05 pebla	CGTTGTGCCTGTAGAGCAACG	Sequenzsuche
62	Per4: 1.1.05 blape	CTTTTCCATATCCTCGTTGTG	Sequenzsuche
63	Fru 1, 1.2.05	CCCACGTTGACTTCGCCTTTATAC	Sequenzsuche
64	Fru 2, 1.2.05	CACTCTGGCCTGTGAAGGTGAAAC	Sequenzsuche
65	Cac1 1.10.	CGTGGTGCGCATTGGGTTGTTAATATG	Sequenzsuche
66	Cac2 1.10.	CATATTAACAACCCAATGCGCACCCACG	Sequenzsuche
67	Cac3 1.10.	GTCTTAGTAGCATAGCTTTGGCTGCTG	Sequenzsuche
68	Cac4 1.10.	CAGCAGCCAAAGCTATGCTACTAAGAC	Sequenzsuche
69	Per per1 1.10.	GGCTAGGGCGGTCCTTTATAGATTTTG	Sequenzsuche
70	Per per2 1.10.	CAAAATCTATAAAGGACCGCCCTAGCC	Sequenzsuche
71	Per per3 1.10.	CTTGGTGAAATCTCGCCTCATCATGAC	Sequenzsuche
72	Per per4 1.10.	GTCATGATGAGGCGAGATTTACCAAG	Sequenzsuche
73	Fru1 1.10.	CGAAGTATGGACTACAGGCTGACAAG	Sequenzsuche
74	Fru2 1.10.	CTTGTCAGCCTGTAGTCCATACTTCG	Sequenzsuche
75	1. cac 5' 1219bp	GATGCAATTGTTTGGTGGTCAGTTC	Sequenzsuche
76	2. cac 3' 1219bp	ACAGCAAAGAGCGTTAACATTGCTG	Sequenzsuche
77	1 Period ap/bla/per	CATCAYGANTAYTACGACAGCAARTCGTC	Sequenzsuche
78	2 Period ap/bla/per	TACGACAGCAARTCGTCRACNGARAC	Sequenzsuche
79	3 Period 5' Blattella +CDS	GARGARAAYGCGCCCTTGCCACCN	Sequenzsuche
80	4 Period ap/bla/per 1:2+4	CTTTTCCATRTCYTCRTTGTGMCKG	Sequenzsuche
81	Period periplaneta 2700 5' +CDS	GGCCAGTATGATTCCTGTTTACTACATTGAG	Sequenzsuche
82	1. Fru 300, 5'	ATGGATCAACAATTCTGCCTGC	Sequenzsuche
83	2. Fru 300, 5'	TGGATCAACAATTCTGCCTGCG	Sequenzsuche
84	3. Fru 300, 5'	GGATCAACAATTCTGCCTGCGA	Sequenzsuche
85	1. Fru 300, 3'	CGGCAACAACTTTGACTAACG	Sequenzsuche

86	2. Fru 300, 3'	TCGGCAACAACTTTGACTAAC	Sequenzsuche
87	3. Fru 300, 3'	ATCGGCAACAACTTTGACTAA	Sequenzsuche
88	1. nonA 5' Primer	GAYTATCGTGCAAATGCNGARAARGC	Sequenzsuche
89	2. nonA 3' Primer	TCCATYTGAGCTTCCAGYTTNTCYTC	Sequenzsuche
90	Insert cac 1	GAATTCGCAGGGCAGAATCTGTCC	Sequenzsuche
91	Insert cac 2	GAATTCCACTCGCAACACTCGCAG	Sequenzsuche
92	Insert fru 1	TTCGAAGCAGGGCAGAATCTGTCC	Sequenzsuche
93	Insert fru 2	TTCGAACACTCGCAACACTCGCAG	Sequenzsuche
94	nonA T7 431->449	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTCT CTGGGCGTTGTCTG	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
95	nonA T7 1323->1339	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTGA GACGCAGGCAAC	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
96	nonA T7 435<-450	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGAC AACGCCAGAG	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
97	nonA T7 1371<-1390	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTCA AGCAGGCTGTTGAGC	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
98	nonA T7 125->143	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACAAT GGACCCAGGAGC	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
99	nonA T7 921->940	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGG TGTACTGATGGCTGC	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
100	nonA T7 949<-968	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGGT CGCAAAGACGCTGTC	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
101	nonA T7 1702<-1720	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTT CATTCTGGCCCCAG	RNAi (<i>G. bimaculatus</i>)
102	Prot1, 5'	AGAACTGAGACGCAGGCAAC	Proteinexpression (Grillen NONA)
103	Prot1, 3'	CAGTCAAGCTTTCAAATATTCCCTGGACC AGCTC	Proteinexpression (Grillen NONA)
104	Prot2, 5'	TTGCGACCTGTAGTTGTGGAACC	Proteinexpression (Grillen NONA)
105	Prot2, 3'	CAGTCAAGCTTTCAATAACGTCGCCTCTT GTTGGTAGG	Proteinexpression (Grillen NONA)
106	NUP 3'	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Primer für RACE-PCR
107	UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Primer für RACE-PCR
108	UPM long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT	Primer für RACE-PCR
109	SMART II A Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCG GG	Primer für mRNA Amplifikation
110	1. partial smart IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCC	Primer für mRNA Amplifikation
111	2. partial CDS III	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG	Primer für mRNA Amplifikation
112	Smart oligo 4	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCA	Primer für mRNA

		TTACGGCCGGG	Amplifikation
113	CDS3 PCR Primer	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG T(30)VN	Primer für mRNA Amplifikation
114	5' PCR Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Primer für mRNA Amplifikation
115	5' CDS Primer	(T)25VN	Primer für mRNA Amplifikation
116	Plib1 1.10.	TTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAG	Kontrollprimer für Genbank (pLib)
117	Plib2 1.10.	TAAGCTAGCTTGCCAAACCTACAGGTG	Kontrollprimer für Genbank (pLib)
118	1. RNAi EGFP 5'	TAATACGACTCACTATAGGGAACGGCCA CAAGTTCAG	Kontrollprimer <i>eGFP</i>
119	2. RNAi EGFP 3'	TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGGAC CATGTGATC	Kontrollprimer <i>eGFP</i>
120	Actin primer 1	AGCTTGTGCGCGCATTGAAAC	Kontrollprimer actin (<i>G. bimaculatus</i>)
121	Actin primer 2	TTCCTAGTACCTGATGCCTGG	Kontrollprimer actin (<i>G. bimaculatus</i>)
122	C1 Dm3'3'XbaI	CTCGTCTAGAGAGACTTGAAAAGCGAAA GAGAACGC	Konstrukte
123	C2Gb 5'	CCATGGCATGTCTGGTGGTCCTACTG	Konstrukte
124	C2mycHis 5'	CTGCAGGAATTCCATATGGGCGGACGC GAAC	Konstrukte
125	C3+C4Gb 5'hs+uast	GCGGCCGCTAATTTTATTCTAAGGGGT ATGTCTGGTGGTC	Konstrukte
126	C4Gb3'puast	TCTAGATTAATAACGTCGCCTCTTGTTGG TAG	Konstrukte
127	C1Dm5'5'EcoR1	TCAGAATTCGCACCGATTGCGACTTTCT GGAGC	Konstrukte
128	C1Dm5'3'Pst1	GCGCTGCAGTTTTTAAATATTATTATTC CTTTCGCTTTATTAATGTGC	Konstrukte
129	C1Gb5'Pst 1	TGACTGCAGATGTCTGGTGGTCCTACTG	Konstrukte
130	C1Gb3'Nco1	AGACCATGGTTAATAACGTCGCCTCTTG TTGGTAG	Konstrukte
131	C1Dm3'5'Nco1	TTGCCATGGTTAATTCGGGGATATGGAA CTGCAATGAGC	Konstrukte
132	C1Dm3'3'SacII	ACGCCGCGGGAGACTTGAAAAGCGAAA GAGAACGC	Konstrukte
133	C2Gb5'NcoI	AGACCATGGCATGTCTGGTGGTCCTACT G	Konstrukte
134	C2GbmychisPstI	TGACTGCAGGAATTCCATATGGGCGGAC GCGAAC	Konstrukte
135	C3C4Gb5'BglII	GAGTGCAGATCTAATTTTATTCTAAGGG GTATGTCTGGTGGTC	Konstrukte

136	C3Gb3'SacII	AGTCCGCGGTTAATAACGTCGCCTCTTG TTGGTAG	Konstrukte
137	C4Gb3'KpnI	CCAGGTACCTTAATAACGTCGCCTCTTG TTGGTAG	Konstrukte
138	C1Dm5'3'	CTGCAGTTTTTAAATATTATTATTTCTTT CGCTTTATTAAAATGTGC	Konstrukte
139	C1Dm5'3'test	TGCTGTGCTGCGGCAACTG	Konstrukte
140	C1Dm5'5'	GCACCGATTGCGACTTTCTGGAGC	Konstrukte
141	C1Dm3'5'	GGATCCTTAATTCGGGGATATGGAAGT CAATGAGC	Konstrukte
142	C1Dm3'3'	TCTAGAGAGACTTGAAAAGCGAAAGAGA ACGC	Konstrukte
143	C1Gb5'	CTGCAGATGTCTGGTGGTCCTACTG	Konstrukte
144	C1Gb3'	GGATCCTTAATAACGTCGCCTCTTGTTG GTAG	Konstrukte
145	Dm.5'C1,EcoR1	GTCGAATTCATGGAAAGTGCGGGGAAAC AAGATAATAACGCCACG	Konstrukte
146	Dm.3'C1,Xba1	AGCGTCTAGATTTCGCATTTGGAAGTCAA TTTCCGT	Konstrukte
147	Dm.5'C1,PstI	TGACTGCAGATGGAAAGTGCGGGGAAA CAAGATAATAACGCCACG	Konstrukte
148	Dm.3'C1,NcoI	ACGACCATGGTTTCGCATTTGGAAGTCAA TTTCCGT	Konstrukte
149	1. SP6 cac for in situ	ATTTAGGTGACACTATAGAATTCCTGGG GTCTTCAC	<i>in-situ</i> Hybridisierung (<i>Gryllus bimaculatus</i>)
150	2. T7 cac for in situ	TAATACGACTCACTATAGGGTGGTACAC GCTTGATGG	<i>in situ</i> Hybridisierung (<i>Gryllus bimaculatus</i>)
151	3. nonA SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTACTGATG GCTGCTTC	<i>in situ</i> Hybridisierung (<i>Gryllus bimaculatus</i>)
152	4. nonA T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATC CTCCTTCTG	<i>in situ</i> Hybridisierung (<i>Gryllus bimaculatus</i>)

5.2 Nukleotidsequenzen nicht weiter bearbeiteter Gene

5.2.1 *cathepsin B* ähnliche Sequenz:

Aus einem Klon der cDNA-Bibliothek wurde eine 606 bp lange Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zum *cathepsin B*-Gen isoliert. Bei CATHEPSIN B handelt es sich um eine Endopeptidase des Cystein-Typs, die den autophagozytosen Zelltod reguliert, sowie proteolytische und katalytische Aktivität besitzt.

```
TTACCAGCACTACTCCGTTCTTCAATACCACAGTGGTTTTTGCCTCTAAGAATCTTGAAG-60
AGGCCTTGACTGCCCAATCGTAGTTCCAGGAATTGGCCACCAACCAATAAGGTACATCT-120
TCTTCAACACCCCAGCCAATAATCTTGATGGCATGGCCCCCAGCTCTGAACCAGAAACA-180
TGTTGATACACACCTGTCTTATATTGTACAAAATCTACATATACTGTGAAAGCAGCTTCC-240
ACAGGTCCATTTTTTCATAATTTCCAACCTGAATTTCTTCAACATCTTGCATAAGGGTATAT-300
GACTTTTGTCCGTGGTAGAGGTCCCTTTGTGTAATCTCGTCTATATCCTGTTTCACATTTT-360
GTATGACATGCTGGAGTTCTCTCTTCATGACACGGTCCACGGCTACCATTACATGATGC-420
TCACATGGCTCAATTTTCATAGGGTTGGCAACCCTGATGAGATCCATAGGGACCTCCACTG-480
ACAATTTCTGTCTCTACCCAGTATTTCCCATGCTGCTTCAGGGAAACCTCCGTTACATCCA-540
AATCCACATGATGAACAACAAGACACCAAGTTTTTCTGATGAGAAAGTGGCAATTCACTT-600
TTTCTT-606
```

5.2.2 *foraging* ähnliche Sequenz

Ein dem *foraging*-Gen sehr ähnliches Sequenzfragment (470bp) wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. Die FORAGING zugeschriebenen molekularen Funktionen umfassen die cGMP-abhängige Proteinkinase-Aktivität, die Serin-/Threoninkinase-Aktivität sowie die Regulation cAMP-abhängiger Proteinkinasen. Die bekannten *Drosophila*-Mutanten des *foraging*-Gens zeigen Auffälligkeiten im larvalen Bewegungs- und Fressverhalten sowie bei der Regulation von Herzkontraktionen.

```
AGATAATGAGTGAAGCTAATTGTGAATTCATTGTCAAACCTCTTTAAGACCTTCAAAGATA-60
GAAAATATCTATATATGCTTATGGAATCCTGTCTTGAAGGAGAACTTTGGACAATTCTAA-120
GAGATAAAGGACACTTTGATGATCCTACTACACGATTCTACACAGCTTGTGTAGTGGAGG-180
CCTTTGACTATTTGCATAGCCGTAACATTATCTACAGGGACTTGAAGCCAGAAAATCTTT-240
TGCTTGATATAAATGGTTATGTGAACTTGTGGACTTCGGTTTTGCCAAGAGATTGCAGC-300
AAGGACGTAAGACATGGACATTCTGCGGTACTCCAGAGTATGTTGCTCCAGAAGTAATTT-360
TGAATAGAGGCCATGACATCAGTGCTGACTATTGGTCTTTGGGTGTGCTAATGTTCGAAC-420
TTCTGACAGGTACTCCATCATTACAGGTGCAGACCCAATGAAGACGTAC-470
```

5.2.3 *Bub3* ähnliche Sequenz

Aus einem Klon der cDNA-Bibliothek wurde ein 616bp lange Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zum *Bub3* (*budding uninhibited by benzimidazoles 3*)-Gen isoliert. Die molekulare Funktion von BUB3 ist weitgehend unbekannt. BUB3 ist während der Mitose an Kontrollmechanismen zum Aufbau des Spindelapparats beteiligt.

```
TCATCATGACTATTACGACAGCATTCAATCAAATGATTCTTGATAAAGACAATATCACTT-60
TTTCCACAACATCCATCTTATAAATACATGGTTGCACATAATATTATGTACACTTGTTCA-120
CAGCATCTCAATATTTCAAGCTTCATATTCACCATTCACCTTGGTTTTGTTTCTTGGTCT-180
GATACATATCTGATAAACACATTATCTTCAGGAACATTTTCTGGAGGGATTTCCTGTTCA-240
TACATATATGAACATGCTATTGCAAGGACAGTACCGTCATGACTGAAGCATAATGATGAT-300
ATAGACGCTGAATAGCGATGAAATTGACACAGACGCCTTTTGTAAAGCCGTCCTCAGATG-360
TTTACATAGCCATCTGATCCACCCGTTGCAAAAGTATTGTAACCTGTATGAAAACCTTATC-420
GCGTTTACAGGTTGTATATGTTCAATACCTCCTTCTTTCAATCGGTGACATTTGAAAGCA-480
TATTTCTTCTTCTGAACCTTCTGGGCTTGTATCCAAATATTCAACGGCTACACGACCTTCA-540
ATACTACTCAAACATAACCCTGCTTATTTGGAAAACAGCGAATACACGAGTCTGATATTT-600
CAAACCTGGaTTCACGC-616
```

5.2.4 *AP-2 sigma* ähnliche Sequenz

Ein dem *AP-2 sigma*-Gen sehr ähnliches Sequenzfragment von 586bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. Beim diesem Gen handelt es sich um ein mit dem Clathrin-Komplex assoziiertes Gen. Dementsprechend ist es an Prozessen wie der Neurotransmittersekretion, der Vesikelentstehung sowie dem intra- und extrazellulären Proteintransport beteiligt. Auf molekularer Ebene ist AP-2 SIGMA an der ATP-Bindung, Protein-Bindung und Proteinkinase-Aktivität beteiligt.

```
CCCACGTTGACCTCGCCTTTGTACATAAACATTCAATTAACAACCTCTCAATACATCTCTA-60
TTTATCATATAGAATACAATTCTATATCGAACATACAAACAATATAGTATTTTGTTTACA-120
TATTTTACATGCATGACAAACATTCGTACACATGGAAAAGAGTATTTGGAACACAATTT-180
TACTTGTTTAAATGTTACTCCAGCGAGTTTAAACATTAACAGTTGCTTCAAGACTTTTGTC-240
TGACTGGTTTCTCTTATTTCCCCAGCTAGAAACATTTTCATCCACAACAGTGTATACCTTG-300
TAGAAATTGAAGACTAGGTCTAACTCGCAAACATTATGGAAATATTCATTTAGAACTTCA-360
ACAAAGTTGTGAATTGCTTCAAGGTAGCAAAGATTGTTATCATTTACATCGACACAAATC-420
AGAAATACAAGCCTGCATATCTTCTATACACAATCTTGAAATTACGAAACTCAACAAAAT-480
TTGTATGCTTCGCATCCCTTACTGTAACAACTGCATGAACCTTCTCAATAAGCTTTTGCT-540
TCTCATCATCATCAAAGGTCAATGTCCAAGGCGAAGTCAACGTCGG-586
```

5.2.5 *Muscle LIM* ähnliche Sequenz

Ein dem *muscle LIM*-Gen sehr ähnliches Sequenzfragment von 331bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. Die molekularen Funktionen des Muscle LIM Proteins werden als Protein bindend und Zink-Ionen bindend beschrieben. Es ist am Prozess der Zelldifferenzierung und der Entwicklung der Skelettmuskulatur beteiligt.

```
TAACGACAGCAAATCGTCAACGAAGGCAACCTTGGCCTTGAGGAGCTTTCAATCCAGCAG-60
TGGGCCTGGCATCAGGATAGGAAATAGTAGATTCTCCATTAGTTGACACAAGGGTTGGGG-120
CATGTCCATAACCAAATCCTTTGGGACCAAACTTCTTTCCATAGCAAGCTTTGCAGTAGA-180
TTTCTCTATCAGGTCCATCACAAGCAAGCACAGAATCCAGAGGTCGGTGGCAATCACAGC-240
AGTTGAAACATTTCTTATGCCACATCGTTCCCTTAGCAAGTTGTTGTTCTGCAGCAAATA-300
CAGCACCTCCACAACGAGGATATGGAAAAGA-331
```

5.2.6 *phosphatidylserine receptor* ähnliche Sequenz

Ein dem *phosphatidylserine receptor*-Gen sehr ähnliches Sequenzfragment von 577bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. Die molekulare Funktion des PHOSPHATIDYLSERINE RECEPTORS ist weitgehend unbekannt. Er ist an der Negativ-Regulation der Apoptose beteiligt.

```
TAACTTGGCCAATGCGCAGGAATCAGAAATTTAAGTGTGGTGAGGATAATGAAGGCTACA-60
GTGTGAAAATGAAGATGAAGTATTATGTTTCAGTATATGTTGACTTCCCAAGATGACAGTC-120
CTCTGTATATATTTGATAGCAGCTTTGGTGAGGTACTTTTTGTGTGCATTTTTTGCTTGAA-180
GCAGAAAATTACTGTAATGTGTGCGAGTATGTTTTATATAAAGTGTTCTTGTGGTGCAGAA-240
ATCCTACTTCTGTGTTTACAGCATGCTCGACGAAAGAAGTTACTAGAAGACTATGAAATT-300
CCTATTTATTTCCGAGATGACTTATTTAAGTATGCAGGGGAGGAACGTAGGCCTCCATAC-360
CGTTGGTTTCGTAATGGGACCAGCACGGTCGGGTACAGGCATTCATATTGATCCTCTAGGA-420
ACTAGTGCTTGGAATGCTCTTGTGTTGGGCATAAAAGGTGGTGTCTGTTCTACTCATA-480
CTCCTAAAGAATTACTGAAGGTCACCTCAGAAGATGGTGGCAAACAGCGAGATGAGGCTA-540
TACCTGGTTTAAAGCATTTATCCTCGTACTAACTTCTGCGCATGGCCCAAGTTAAT-577
```

5.2.7 *TCP-1 subunit* ähnliche Sequenz

Aus einem Klon der cDNA Bibliothek wurde ein 632bp lange Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zum *Tcp-1* (*T-complex protein 1*)-Gen isoliert. TCP-1 zeigt ATPase-Aktivität und ist in Proteinbindungs- und Phosphorylierungsmechanismen involviert. Außerdem ist es an Proteinfaltungsprozessen, Phagozytose sowie der Organisation und Biosynthese des Spindelapparats beteiligt.

TGCTCGGGAGGTTGGTCCTAGATTTGCTTTCAAGCACACGCTTCACCACACACAGAGCAT-60
 CATGAACAGATCGTTCCATCTCATCACAATAAAAAATCGTTGGGTCCACGAAGAACAATGG-120
 AACTTGCAGTTCGAGCCTTCGGTCCTTTGATCAAAATGAGTTCATCGTCACAACTGTGT-180
 CTTGAACGACTTCTGCTGCTTCACCAATAAACTGGTATCAAACTCTCCTCACCTTCTA-240
 AATTTGACAGTGAAGTAACATAAGCAGCTCCTGTAGCTTTGGCAATCCTCTTCAAGTCTG-300
 CTTTCTTTACACGCCGAACAGCCATTGCACCAGCCTCAACAAAATACTTCAAGCACAAAT-360
 CATCAATTCCACCAGAACATAGAATAACATTAGCACCAGAAGCTAATATTTTATGGATCT-420
 TCTCTTTTGTAAATATCTATTTTACGTTGTCTAATTCCATCAAGCTTCTCGGGATCAGTTA-480
 CAAGGACCTGTACTCCTAATTTTATCTTAGTTTTCTGAAGAGAGAAATCCAAACATGCAA-540
 CTTTTGCATTAATGATCTTTTTTGGGCATTGCTTGAGAAGCAACAGTGCAATTAAGAGCAT-600
 AACCTGGAATCAACAACTTTCCCTAGCACTG-632

5.2.8 *Yippee interacting protein 2* ähnliche Sequenz

Ein dem *Yippee interacting protein 2*-Gen sehr ähnliches Sequenzfragment von 492bp wurde über PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. YIPPEE zeigt Acetyl-CoA C-Acyltransferase-Aktivität und ist somit an der Fettsäure-Oxidation beteiligt.

GTCACTGCTGGCTCATCATCAGGCATCTGTGATGGAGCAGGTGCTGTTCTCCTCGCATCA-60
 GAAGAAGCTGTCAAGTCTCTTGGACTGAAACCTCTGGCCCGTTTGGTAGCCTACAGCGTT-120
 GTGGGTGTGGAACCTTCCATCATGGGCATTGGCCCTGCCCTGCCATTCAAAAATTGTTG-180
 AAGACTGCTGGCAAGACCTTGGCCGATATTGACCTGGTGGAGATCAATGAGGCATTTGGA-240
 GCTCAGACACTTGCATGCGCAAAAGAGCTGAAGTTGGACCTGGGAAAGCTGAATGTTAAT-300
 GGAGGAGCGATAGCGCTTGGCCATCCCCTTGGTGCATCTGGCTCGCGTATAACCGCTCAT-360
 CTCGTTTCACTGAAGTCAAGGAGGAGGAATGCTAAGCTGGGCGTTGGCTCCGCATGTATTGGT-420
 GGAGGTCAGGGCATTGCCCTACTTCTGGAGAATGTGCAATGAGGCGAAGACTGATGGATG-480
 TTTACCTGACTT-492

5.3 Nukleotidsequenzen verwendeter dsRNAs

Unterstrichen sind die jeweils verwendeten genspezifischen Primersequenzen, fett hervorgehoben sind relevante Start- und Stopkodons.

5.3.1 Nukleotidsequenz der verwendeten eGFP-dsRNA (ohne T7-Sequenzen)

AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAA
GTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG
 TGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
 GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
 GTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
 TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
 AACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
 CTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC
 AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCT

5.3.2 Nukleotidsequenz der verwendeten *nonA*-dsRNAs (ohne T7-Sequenzen)

Sequenz 1:

ATGGACCCCAGGAGCAACCTGGGCAGAATTCTCACCCCGGCGGTCCGCGCGGTGGACGTGGCGGCGGT
GGCGGTGGTCCTGGACGCCAAAGGTTCCGGCGGCCAAGGACGTGGAGGAAGAGACGATTCAAGGATGAG
AAATCAAGATATTAAGTCTGACATGAAATTGGATGTAGAAGGTGGTCCTGGTGGTCAGGGGGCTATGA
TGGGACCTGGGGGTCTGGGCGTGGAGGTGGTCGTATCAACAGGTTTCAGAGGTGGCATCGGAGGAGCG
GGACGTGATGAAAGAGGCATGCGGTTCACAGGATGATCGTCTCAATGAAaGACTTGCCGCTCTGCAAGC
TCCAATCATGATTTACCTCCACAAGACACACATGAGAAGAAGTTCTCTGGGCGTTGTCTGTTTATACA
TTGGTAATTTGACTAATGATGTGACGGAGGAAGAAATCAGCCAGTTATTTGCACCGTATGGAGAAACA
GCAGAATTGTTTGTCAACAAGGAAAAGAACTTTGCATTTATTTCGCCTGGATTATAGAGCAAATGCTGA
AAAGGCAAAAAGAGAACTTGATGGATCTTTGAGAAAAGGTAGAGCTCTTAAAGTGCGCTTTGCCCTC
ATAGTGCTTGCATTAAGGTGAAGAACCTTACACCTTGGGTTACCAATGAATTGCTGGAGAAAGCATTT
TCAGTGTTTGGTGAAGTTGAGCGTGCTGTTATAATTGTTGATGAGAGGGGGAAGTCAATGGAGGAAGG
TATTGTAGAATTTGCCCGAAAACCGGTTGCACAGATGGCATTGAGGAGGTGTACTGATGGCTGC

Sequenz 2:

GACAGCGTCTTTGCGACCTGTAGTTGTGGAACCTTTTGAACAACCTTGATGATGTTGATGGTTATGCTG
AAAAGAATCTTCCAAAGAAAAATCCAGAATATTATAAGGCTCGGGAGGTTGGTCCTAGATTTGCTAAT
CCTGCAAGTTTTGAGTATGAATATGGTACTCGTTGGAACAACCTATATGAACCTTCATAAACAGAAGGA
GGATGCTCTTAAACGGGAGATGAAAATGGAAGAAGAAAACTTGAAGCTCAAATGGAATATGCTCGTT
ATGAGCATGAACTGAAATTTTGAGAGAACAACCTGAGACAGCGTGAACCTTGATCGTGAACGTCAAAAA
CGTGAGTGGGAGATGAAAGAGCGACAAGCAGAAGAACAGAGGATAGCTGATGAAGAACGTATGAGACG
TCAACAAGAAGAAATGCAGTTGCGGATGCATCATCAAGAGGAAGAACTGAGACGCAGGCAACAAGAGA
ACTCTCTCTTTATGCAGGCTCATCAGCTCAACAGCCTGCTTGACCAGCAAGAGCAGGCATTGAGGCAG
ACTCCTGCTGGCTATGATTCTCCATCAGCTGAGCAAGCGTTAAGAGATTATGATGCAGTTGGAGCTGG
TCCAGGGAATATTCCACCGGACCCGAAGTCTTTTATGGATGCGTACGACCGTGGAGCTGGACGCTACG
ATGGTCGCGGAGACATGCGTGAGGAAATGGGGGTCCTAATGCCGGGCCACGTGGAGGAAACCCGCGT
GGACGCTGGGGCCAGAATGAA

5.4 Nukleotidsequenzen des verwendeten P-Elements (ohne Erkennungs-Sequenzen)

TAAGAATTAATTTTATTTCTAAGGGGT**ATGT**CTGGTGGTCCTACTGAAATGAAAACCTGAAGGAGAACG
CGATACAAATGGACCCCAGGAGCAACCTGGGCAGAATTCTCACCCCGGCGGTCCGCGCGGTGGACGTG
GCGGCGGTGGCGGTGGTCCTGGACGCCAAAGGTTCCGGCGGCCAAGGACGTGGAGGAAGAGACGATTCA
AGGATGAGAAATCAAGATATTAAGTCTGACATGAAATTGGATGTAGAAGGTGGTCCTGGTGGTCAGGG
GGCTATGATGGGACCTGGGGGTCTGGGCGTGGAGGTGGTCGTATCAACAGGTTTCAGAGGTGGCATCG
GAGGAGCGGGACGTGATGAAAGAGGCATGCGGTTCACAGGATGATCGTCTCAATGAAAGACTTGCCGCT
CTGCAAGCTCCAATCATGATTTACCTCCACAAGACACACATGAGAAGAAGTTCTCTGGGCGTTGTCTG
TTTATACATTGGTAATTTGACTAATGATGTGACGGAGGAAGAAATCAGCCAGTTATTTGCACCGTATG
GAGAAACAGCAGAATTGTTTGTCAACAAGGAAAAGAACTTTGCATTTATTTCGCCTGGATTATAGAGCA
AATGCTGAAAAGGCAAAAAGAGAACTTGATGGATCTTTGAGAAAAGGTAGAGCTCTTAAAGTGCGCTT
TGCCCTCATAGTGCTTGCATTAAGGTGAAGAACCTTACACCTTGGGTTACCAATGAATTGCTGGAGA
AAGCATTTTCAGTGTTTGGTGAAGTTGAGCGTGCTGTTATAATTGTTGATGAGAGGGGGAAGTCAATG
GAGGAAGGTATTGTAGAATTTGCCCGAAAACCGGTTGCACAGATGGCATTGAGGAGGTGTACTGATGG
CTGCTTCTTTCTGACAGCGTCTTTGCGACCTGTAGTTGTGGAACCTTTTGAACAACCTTGATGATGTTG
ATGGTTATGCTGAAAAGAATCTTCCAAAGAAAAATCCAGAATATTATAAGGCTCGGGAGGTTGGTCCT
AGATTTGCTAATCCTGCAAGTTTTGAGTATGAATATGGTACTCGTTGGAACAACCTATATGAACCTTCA
TAAACAGAAGGAGGATGCTCTTAAACGGGAGATGAAAATGGAAGAAGAAAACTTGAAGCTCAAATGG
AATATGCTCGTTATGAGCATGAACTGAAATTTTGAAGAAACAACCTGAGACAGCGTGAACCTTGATCGT

GAACGTCAAAAACGTGAGTGGGAGATGAAAGAGCGACAAGCAGGAGAACAGAGGATAGCTGATGAAGA
 ACGTATGAGACGTCAACAAGAAGAAATGCAGTTGCGGACGCATCATCAAGAGGAAGAAGTGAAGACGCA
 GGCAACAAGAGAACTCTCTCTTTATGCAGGCTCATCAGCTCAACAGCCTGCTTGACCAGCAAGAGCAG
 GCATTGAGGCAGACTCCTGCTGGCTATGATTCTCCATCAGCTGAGCAAGCGTTAAGAGATTATGATGC
 AGTTGGAGCTGGTCCAGGGAATATTCACCGGACCCGAAGTCTTTTATGGATGCGTACGACCGTGGAG
 CTGGACGCTACGATGGTTCGCGGAGACATGCGTGAGGAAATGGGGGGTCCTAATGCCGGGCCACGTGGA
 GGAAACCCGCGTGACGCTGGGGCCAGAATGAACGTAGGGGTGGTGATGATTACCCTACCAACAAGAG
 GCGACGTTAT**TAA**

5.5 ilder von *Gryllus bimaculatus*

Es ist jeweils links eine männliche und rechts eine weibliche Grille abgebildet.

5.5.1 Bilder von wildtypischen *Gryllus bimaculatus*

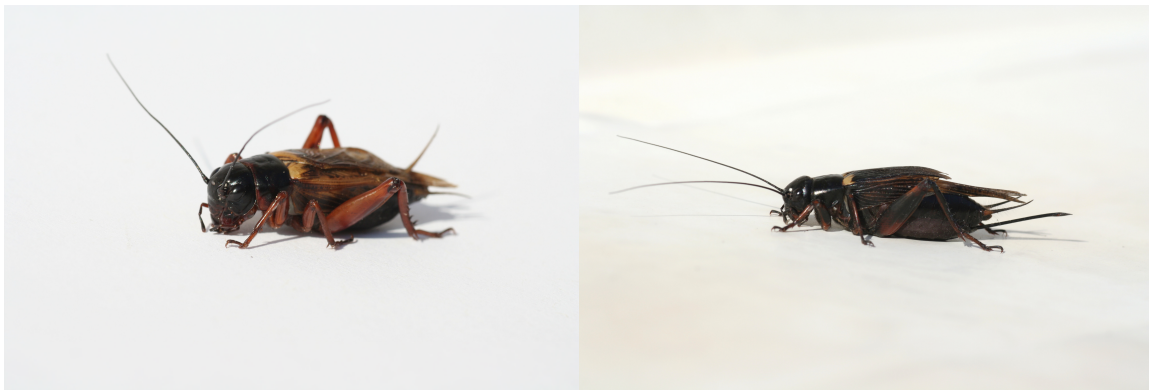


Abbildung 33: Wildtypische adulte *Gryllus bimaculatus*

links Männchen, rechts Weibchen.

5.5.2 Bilder von weißäugigen *Gryllus bimaculatus*



Abbildung 34: Weißäugige adulte *Gryllus bimaculatus*

links Männchen, rechts Weibchen.

5.6 Bilder der *Drosophila melanogaster* p[G.b.nonA]-Transformanten



Abbildung 35: *Drosophila melanogaster* p[G.b.nonA]-Transformanten

links p[G.b.nonA A], mitte p[G.b.nonA B], rechts p[G.b.nonA C].

Literaturverzeichnis

- Ahlquist P: RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 2002;296:1270-1273.
- Alexander RD: The taxonomy of the field crickets of the Eastern United States (Orthoptera: Gryllidae: Acheta). *Ann. ent. Soc. Am.* 1957;50:584-602.
- Alexander RD: Aggressiveness, Territoriality, and Sexual Behavior in Field Crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Behaviour* 1961;17:130-223.
- Amdam GV, Simoes ZLP, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW: Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *Bmc Biotechnology* 2003;3:-.
- Amdam GV, Norberg K, Page RE, Erber J, Scheiner R: Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research* 2006;169:201-205.
- Arikawa K, Kawamata K, Suzuki T, Eguchi E: Daily Changes of Structure, Function and Rhodopsin Content in the Compound Eye of the Crab *Hemigrapsus-Sanguineus*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1987;161:161-174.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B: A Component of Calcium-Activated Potassium Channels Encoded by the *Drosophila*-Slo Locus. *Science* 1991;253:551-555.
- Beckers OM, Schul J: Developmental plasticity of mating calls enables acoustic communication in diverse environments. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 2008;275:1243-1248.
- Bembenek J, Itokawa K, Hiragaki S, Shao QM, Tufail M, Takeda M: Molecular characterization and distribution of CYCLE protein from *Athalia rosae*. *Journal of Insect Physiology* 2007;53:418-427.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW: The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 2003;114:419-429.
- Bradbury, Vehrencamp: Principles of animal communication. 1998.
- Bradford MM: Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
- Bryceson KP: The Effect of Screening Pigment Migration on Spectral Sensitivity in a Crayfish Reflecting Superposition Eye. *Journal of Experimental Biology* 1986;125:401-404.
- Bucher G, Scholten J, Klingler M: Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology* 2002;12:R85-R86.
- Buckingham SD, Esmaeili B, Wood M, Sattelle DB: RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human Molecular Genetics* 2004;13:R275-R288.

- Buerli T, Pellegrino C, Baer K, Lardi-Studler B, Chudotvorova I, Fritschy J-M, Medina I, Fuhrer C: Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. 2007;2:3090-3101.
- Cade WH: Nightly and Hourly Rates of Attraction of Flying Field Crickets, *Gryllus-Integer*, to Conspecific Song. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 1989;67:2540-2542.
- Cahill GM, Besharse JC: Circadian Rhythmicity in Vertebrate Retinas - Regulation by a Photoreceptor Oscillator. *Progress in Retinal and Eye Research* 1995;14:267-291.
- Campesan S, Dubrova Y, Hall JC, Kyriacou CP: The nonA gene in *Drosophila* conveys species-specific behavioral characteristics. *Genetics* 2001;158:1535-1543.
- Campesan S, Chalmers D, Sandrelli F, Megighian A, Peixoto AA, Costa R, Kyriacou CP: Comparative analysis of the nonA region in *Drosophila* identifies a highly diverged 5' gene that may constrain nonA promoter evolution. *Genetics* 2001;157:751-764.
- Chen B, Meinertzhagen IA, Shaw SR: Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1999;185:393-404.
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162:156-159.
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W: Prevention of Pre-Pcr Mis-Priming and Primer Dimerization Improves Low-Copy-Number Amplifications. *Nucleic Acids Research* 1992;20:1717-1723.
- Doherty JA: Temperature Coupling and Trade-Off Phenomena in the Acoustic Communication-System of the Cricket, *Gryllus-Bimaculatus* De Geer (*Gryllidae*). *Journal of Experimental Biology* 1985;114:17-35.
- Dong Y, Friedrich M: Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *Bmc Biotechnology* 2005;5:-.
- Farooqui T, Vaessin H, Smith BH: Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *Journal of Insect Physiology* 2004;50:701-713.
- Feinberg AP, Vogelstein B: A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Analytical Biochemistry* 1983;132:6-13.
- Feinberg EH, Hunter CP: Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 2003;301:1545-1547.
- Feng GP, Deak P, Kasbekar DP, Gil DW, Hall LM: Cytogenetic and Molecular Localization of Tipe - a Gene Affecting Sodium-Channels in *Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* 1995;139:1679-1688.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
- Fleissner G, Heinrichs S: Neurosecretory-Cells in the Circadian-Clock System of the Scorpion, *Androctonus-Australis*. *Cell and Tissue Research* 1982;224:233-238.

- Gailey DA, Hall JC: Behavioral and Cytogenetic Analysis of the Fruitless Phenotype. *Behavior Genetics* 1988;18:716-717.
- Gailey DA, Siegel RW: A Mutant Strain in *Drosophila-Melanogaster* That Is Defective in Courtship Behavioral Cues. *Animal Behaviour* 1989;38:163-169.
- Gaus G, Casaretto M, Kass L: The effect of neuropeptides from *Limulus* on its circadian rhythm in retinal sensitivity. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1997;180:137-142.
- Gerhardt HC: Temperature Coupling in Vocal Communication-System of Gray Tree Frog, *Hyla-Versicolor*. *Science* 1978;199:992-994.
- Giebultowicz JM, Stanewsky R, Hall JC, Hege DM: Transplanted *Drosophila* excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. *Current Biology* 2000;10:107-110.
- Giebultowicz JM: Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annual Review of Entomology* 2000;45:769-793.
- Goto SG, Denlinger DL: Short-day and long-day expression patterns of genes involved in the flesh fly clock mechanism: period, timeless, cycle and cryptochrome. *Journal of Insect Physiology* 2002;48:803-816.
- Gray DA, Cade WH: Sex, death and genetic variation: natural and sexual selection on cricket song. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 1999;266:707-709.
- Greenspan RJ: A kinder, gentler genetic analysis of behavior: dissection gives way to modulation. *Current Opinion in Neurobiology* 1997;7:805-811.
- Gregory TR, Johnston JS: Genome size diversity in the family Drosophilidae. *Heredity* 2008;101:228-238.
- He ZB, Cao YQ, Yin YP, Wang ZK, Chen B, Peng GX, Xia YX: Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Development Growth & Differentiation* 2006;48:439-445.
- Hedrick A, Weber T: Variance in female responses to the fine structure of male song in the field cricket, *Gryllus integer*. *Behavioral Ecology* 1998;9:582-591.
- Hedrick, Perez, Lichti, Yew.: Temperature preferences of male field crickets (*Gryllus integer*) alter their mating calls. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 2002;188:799-805.
- Heisenberg M: Comparative Behavioral Studies on 2 Visual Mutants of *Drosophila*. *Journal of Comparative Physiology* 1972;80:119-&.
- Helfrich-Forster C: The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* 2004;190:601-613.
- Hennig RM, Otto D: Distributed control of song pattern generation in crickets revealed by lesions to the thoracic ganglia. *Zoology-Analysis of Complex Systems* 1996;99:268-276.
- Hoikkala A, Paalysaho S, Aspi J, Lumme J: Localization of genes affecting species differences in male courtship song between *Drosophila virilis* and *D-littoralis*. *Genetical Research* 2000;75:37-45.

- Horridge GA, Duniec J, Marcelja L: A 24-Hour Cycle in Single Locust and Mantis Photoreceptors. *Journal of Experimental Biology* 1981;91:307-&.
- Hotta Y, Benzer S: Abnormal Electroretinograms in Visual Mutants of *Drosophila*. *Nature* 1969;222:354-&.
- Huber F: The role of the central nervous system in Orthoptera during the co-ordination and control of stridulation; in B. R-G, (ed), *Acoustic behavior of animals*; Elsevier, 1964, pp 440-488.
- Huppi K, Martin SE, Caplen NJ: Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Molecular Cell* 2005;17:1-10.
- Jang Y, Gerhardt HC: Temperature effects on the temporal properties of calling songs in the crickets *Gryllus fultoni* and *G-Vernalis*: Implications for reproductive isolation in sympatric populations. *Journal of Insect Behavior* 2007;20:33-52.
- Jones KR, Rubin GM: Molecular Analysis of No-on-Transient-a, a Gene Required for Normal Vision in *Drosophila*. *Neuron* 1990;4:711-723.
- Kennedy S, Wang D, Ruvkun G: A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C-elegans*. *Nature* 2004;427:645-649.
- Keohavong P, Kat AG, Cariello NF, Thilly WG: DNA Amplification Invitro Using T4-DNA Polymerase. *DNA-a Journal of Molecular & Cellular Biology* 1988;7:63-70.
- Kulkarni SJ, Steinlauf AF, Hall JC: The Dissonance Mutant of Courtship Song in *Drosophila-Melanogaster* - Isolation, Behavior and Cytogenetics. *Genetics* 1988;118:267-285.
- Kutsch W: Neuromuscular Activity in 3 Cricket Species During Various Behavioural Patterns. *Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie* 1969;63:335-&.
- Kyriacou CP, Hall JC: Circadian-Rhythm Mutations in *Drosophila-Melanogaster* Affect Short-Term Fluctuations in the Males Courtship Song. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1980;77:6729-6733.
- Kyriacou CP, Hall JC: The Function of Courtship Song Rhythms in *Drosophila*. *Animal Behaviour* 1982;30:794-801.
- Kyte J, Doolittle RF: A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology* 1982;157:105-132.
- Lindsley DL, Grell EH: *Genetic variations of Drosophila melanogaster*, 1968.
- Lindsley DL, Zimm G: *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, 1992.
- Loher W: Circadian Control of Stridulation in Cricket *Teleogryllus-Commodus* Walker. *Journal of Comparative Physiology* 1962;79:173-&.
- Loughney K, Kreber R, Ganetzky B: Molecular Analysis of the Para Locus, a Sodium-Channel Gene in *Drosophila*. *Cell* 1989;58:1143-1154.
- Lu J, Zoran MJ, Cassone VM: Daily and Circadian Variation in the Electroretinogram of the Domestic-Fowl - Effects of Melatonin. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1995;177:299-306.
- Lupien M, Marshall S, Leser W, Pollack GS, Honegger HW: Antibodies against the PER protein of *Drosophila* label neurons in the optic lobe, central brain, and thoracic ganglia of the crickets *Teleogryllus commodus* and *Teleogryllus oceanicus*. *Cell and Tissue Research* 2003;312:377-391.

- Maestro JL, Belles X: Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2006;62:73-79.
- Manoli DS, Foss M, Villella A, Taylor BJ, Hall JC, Baker BS: Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* 2005;436:395-400.
- McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen JZ, Sharp PA: Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *Journal of Immunology* 2002;169:5754-5760.
- Meinertzhagen IA, Pyza E: Neurotransmitter regulation of circadian structural changes in the fly's visual system. *Microscopy Research and Technique* 1999;45:96-105.
- Meister G, Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-349.
- Meyering-Vos M, Merz S, Sertkol M, Hoffmann KH: Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006;36:492-504.
- Meyering-Vos M, Muller A: RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 2007;53:840-848.
- Meyering-Vos M, Muller A: Structure of the sulfakinin cDNA and gene expression from the Mediterranean field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Insect Molecular Biology* 2007;16:445-454.
- Mito T, Kobayashi C, Sarashina I, Zhang HJ, Shinahara W, Miyawaki K, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S: even-skipped has gap-like, pair-rule-like, and segmental functions in the cricket *Gryllus bimaculatus*, a basal, intermediate germ insect (Orthoptera). *Developmental Biology* 2007;303:202-213.
- Miyawaki K, Mito T, Sarashina I, Zhang HJ, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S: Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. *Mechanisms of Development* 2004;121:119-130.
- Moriyama Y, Sakamoto T, Karpova SG, Matsumoto A, Noji S, Tomioka K: RNA interference of the clock gene period disrupts circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Biological Rhythms* 2008;23:308-318.
- Nakatani I, Adachi T, Murayama O: Selection of light or darkness, locomotor, and stridulatory activities in the cricket, *Gryllus bimaculatus* Degeer (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Insect Physiology* 1994;40:1007-1015.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. *Plant Cell* 1990;2:279-289.
- Ozerskii PV, Shchekanov EE: On interrelations between temporal parameters of the calling song of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2001;37:48-52.
- Paallysaho S, Huttunen S, Hoikkala A: Identification of X chromosomal restriction fragment length polymorphism markers and their use in a gene localization study in *Drosophila virilis* and *D. littoralis*. *Genome* 2001;44:242-248.

- Pak WL, Grossie J, White NV: Nonphototactic Mutants in a Study of Vision of *Drosophila*. *Nature* 1969;222:351-&.
- Peixoto AA, Hall JC: Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics* 1998;148:827-838.
- Petitpierre E: Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the coleoptera. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 1996;25:115-134.
- Pires A, Hoy RR: Temperature Coupling in Cricket Acoustic Communication .1. Field and Laboratory Studies of Temperature Effects on Calling Song Production and Recognition in *Gryllus-Firmus*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1992;171:69-78.
- Pires A, Hoy RR: Temperature Coupling in Cricket Acoustic Communication .2. Localization of Temperature Effects on Song Production and Recognition Networks in *Gryllus-Firmus*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1992;171:79-92.
- Pittendrigh C, Bruce V, Kaus P: On the Significance of Transients in Daily Rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1958;44:965-973.
- Pollack GS, Hoy R: Phonotaxis to Individual Rhythmic Components of a Complex Cricket Calling Song. *Journal of Comparative Physiology* 1981;144:367-373.
- Popov AV, Shuvalov VF: Phonotactic Behavior of Crickets. *Journal of Comparative Physiology* 1977;119:111-126.
- Rasch EM: DNA Content of Sperm and Hemocyte Nuclei of Silkworm, *Bombyx-Mori* L. *Chromosoma* 1974;45:1-26.
- Rendahl KG, Jones KR, Kulkarni SJ, Bagully SH, Hall JC: The Dissonance Mutation at the No-on-Transient-a Locus of *Drosophila-Melanogaster* - Genetic-Control of Courtship Song and Visual Behaviors by a Protein with Putative Rna-Binding Motifs. *Journal of Neuroscience* 1992;12:390-407.
- Rendahl KG, Gaukhshteyn N, Wheeler DA, Fry TA, Hall JC: Defects in courtship and vision caused by amino acid substitutions in a putative RNA-binding protein encoded by the no-on-transient A (nonA) gene of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 1996;16:1511-1522.
- Rendahl KG, Hall JC: Temporally manipulated rescue of visual and courtship abnormalities caused by a nonA mutation in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics* 1996;10:247-256.
- Ritchie MG, Saarikettu M, Livingstone S, Hoikkala A: Characterization of female preference functions for *Drosophila montana* courtship song and a test of the temperature coupling hypothesis. *Evolution* 2001;55:721-727.
- Romano N, Macino G: Quelling - Transient Inactivation of Gene-Expression in *Neurospora-Crassa* by Transformation with Homologous Sequences. *Molecular Microbiology* 1992;6:3343-3353.
- Saifullah ASM, Tomioka K: Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Experimental Biology* 2002;205:1305-1314.
- Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- Sandrelli F, Campesan S, Rossetto MG, Benna C, Zieger E, Megighian A, Couchman M, Kyriacou CP, Costa R: Molecular dissection of the 5' region of no-on-transientA of *Drosophila melanogaster* reveals cis-regulation by adjacent dGpi1 sequences. *Genetics* 2001;157:765-775.
- Sandrelli F, Cappellozza S, Benna C, Saviane A, Mastella A, Mazzotta GM, Moreau S, Pegoraro M, Piccin A, Zordan MA, Cappellozza L, Kyriacou CP, Costa R: Phenotypic effects induced by knock-down of the period clock gene in *Bombyx mori*. *Genetical Research* 2007;89:73-84.
- Sauman I, Reppert SM: Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: Developmental appearance of PTTH-Expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Developmental Biology* 1996;178:418-429.
- Scherer LJ, Rossi JJ: Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology* 2003;21:1457-1465.
- Schoppmeier M, Damen WGM: Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of Distal-less is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation. *Development Genes and Evolution* 2001;211:76-82.
- Shaw AP, Collazo CR, Easterling K, Young CD, Karwoski CJ: Circadian-Rhythm in the Visual-System of the Lizard *Anolis-Carolinensis*. *Journal of Biological Rhythms* 1993;8:107-124.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RHA, Fire A: On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001;107:465-476.
- Skovmand O, Pedersen SB: Song Recognition and Song Pattern in a Shorthorned Grasshopper. *Journal of Comparative Physiology* 1983;153:393-401.
- Stanewsky R, Rendahl KG, Dill M, Saumweber H: Genetic and Molecular Analysis of the X-Chromosomal Region 14b17-14c4 in *Drosophila-Melanogaster* - Loss of Function in Nona, a Nuclear-Protein Common to Many Cell-Types, Results in Specific Physiological and Behavioral Defects. *Genetics* 1993;135:419-442.
- Stanewsky R, Fry TA, Reim I, Saumweber H, Hall JC: Bioassaying putative RNA-binding motifs in a protein encoded by a gene that influences courtship and visually mediated behavior in *Drosophila*: In vitro mutagenesis of nonA. *Genetics* 1996;143:259-275.
- Takahashi T, Hamada A, Miyawaki K, Matsumoto Y, Mito T, Noji S, Mizunami M: Systemic RNA interference for the study of learning and memory in an insect. *Journal of Neuroscience Methods* 2009;179:9-15.
- Tomioka K, Chiba Y: Persistence of Circadian Erg Rhythm in the Cricket with Optic Tract Severed. *Naturwissenschaften* 1982;69:395-396.
- Tomioka K, Chiba Y: Post-Embryonic Development of Circadian-Rhythm in the Cricket, *Gryllus-Bimaculatus* - a Rhythm Reversal. *Journal of Comparative Physiology* 1982;147:299-304.
- Tomioka K, Chiba Y: Effects of Nymphal Stage Optic-Nerve Severance or Optic Lobe Removal on the Circadian Locomotor Rhythm of the Cricket, *Gryllus-Bimaculatus*. *Zoological Science* 1984;1:375-382.

- Tomioka K, Chiba Y: Characterization of an Optic Lobe Circadian Pacemaker by Insitu and Invitro Recording of Neural Activity in the Cricket, *Gryllus-Bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1992;171:1-7.
- Tomioka K, Sakamoto M, Harui Y, Matsumoto N, Matsumoto A: Light and temperature cooperate to regulate the circadian locomotor rhythm of wild type and period mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 1998;44:587-596.
- Tomioka K, Abdelsalam S: Circadian organization in hemimetabolous insects. *Zoological Science* 2004;21:1153-1162.
- Tomoyasu Y, Denell RE: Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* 2004;214:575-578.
- Treherne JE: In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; in K. G. A., G. G. A., (eds), *Blood-brain barrier*; Pergamon Press, 1985, vol. 5, pp 115–137.
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD: RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 2006;15:383-391.
- Villella A, Hall JC: Courtship anomalies caused by doublesex mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1996;143:331-344.
- Villella A, Gailey DA, Berwald B, Ohshima S, Barnes PT, Hall JC: Extended reproductive roles of the fruitless gene in *Drosophila melanogaster* revealed by behavioral analysis of new fru mutants. *Genetics* 1997;147:1107-1130.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC: Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 1998;95:177-187.
- von Besser H, Schnabel P, Wieland C, Fritz E, Stanewsky R, Saumweber H: The Puff-Specific *Drosophila* Protein-Bj6, Encoded by the Gene *No-on Transient-a*, Shows Homology to Rna-Binding Proteins. *Chromosoma* 1990;100:37-47.
- von Schilcher F: Behavior of *Cacophony*, a Courtship Song Mutant in *Drosophila-Melanogaster*. *Behavioral Biology* 1976;17:187-196.
- Walker SE, Cade WH: The effects of temperature and age on calling song in a field cricket with a complex calling song, *Teleogryllus oceanicus* (Orthoptera : Gryllidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 2003;81:1414-1420.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T: Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001;411:834-842.
- Weber T, Thorson J: Auditory-Behavior of the Cricket .4. Interaction of Direction of Tracking with Perceived Temporal Pattern in Split-Song Paradigms. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1988;163:13-22.
- Wheeler DA, Kyriacou CP, Greenacre ML, Yu Q, Rutila JE, Rosbash M, Hall JC: Molecular Transfer of a Species-Specific Behavior from *Drosophila-Simulans* to *Drosophila-Melanogaster*. *Science* 1991;251:1082-1085.
- Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP: Systemic RNAi in *C-elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 2002;295:2456-2459.
- Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH, Hunter CP: *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:10565-10570.

- Wise S, Davis NT, Tyndale E, Noveral J, Folwell MG, Bedian V, Emery IF, Siwicki KK: Neuroanatomical studies of period gene expression in the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology* 2002;447:366-380.
- Wyckoff M, Rodbard D, Chrambach A: Optimization of Polyacrylamide-Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl-Sulfate (Sds-Page) Using Multiphasic Buffer Systems - Conditions for Stacking and Valid Rf Measurement. *Federation Proceedings* 1976;35:1383-1383.
- Yamamoto D, Jallon J-M, Komatsu A: GENETIC DISSECTION OF SEXUAL BEHAVIOR IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Annual Review of Entomology* 1997;42: 551 - 585.
- Yang D, Lu H, Erickson JW: Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Current Biology* 2000;10:1191-1200.
- Zhantiev RD: *Bioakustika nesekomych*, 1981.
- Zhou XG, Oi FM, Scharf ME: Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:4499-4504.
- Zuk M: Parasite Load, Body Size, and Age of Wild-Caught Male Field Crickets (Orthoptera, Gryllidae) - Effects on Sexual Selection. *Evolution* 1988;42:969-976.

Danksagung

Herzlichen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Ronacher für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für seine uneingeschränkte Gesprächsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen sowie für die stets freundliche Atmosphäre in unserer Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Harald Saumweber für die Co-Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Aufnahme in sein Labor und die Bereitstellung eines molekularbiologischen Arbeitsplatzes.

Herrn PD Dr. Matthias Hennig danke ich für anregende Diskussionen und seine Unterstützung bei den akustischen Experimenten.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Frieder Mayer und Frau Dr. Jana Ustinova für ihre stetige und offene Kooperationsbereitschaft.

Diese Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“. In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Prof. Dr. B. Walz für sein Engagement als Sprecher des Graduiertenkollegs sowie Herrn Prof. Dr. Joachim Erber, der mich an seinem Kryotom hat arbeiten lassen.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Verhaltensphysiologie, der Arbeitsgruppe Zytogenetik und den Kollegen aus dem GRK 837. Insbesondere danke ich Dr. Gunnar Grah für die zahllosen gemeinsamen Stunden in unserer Denkhütte, in denen wir uns selten schweigend gegenüber saßen, Daniela Neuhofer für den Wiener Charme, Olaf Kutzki für den Rock'n Roll und den Berliner Charme, Phil Bischofberger für seine Hilfsbereitschaft und Kollegialität im und außerhalb des Labors, sowie Dr. Harald Eggert, Irina Passow und Ursula Kressner für ihre Unterstützung im Laboralltag. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Claudia Niggebrügge, Dr. Lars Vollborn und Dr. Christian Krach für viele aufbauende Diskussionen. Mein Dank geht auch an Regina Lübcke, die viel Arbeit mit der Zucht meiner Versuchstiere hatte.

Ich danke den Kollegen des 1. allgemeinen Berliner P&T Clubs 2007: Dr. Bettina Schewe, Dr. Carsten Hille, Samir Mujagic, Andreas Behrends, Dr. Britta Troppmann, Markus Thamm und Phil Bischofberger.

Großer Dank gilt meinen Eltern für ihren unermüthlichen Einsatz als Babysitter. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Frau Karoline. Ohne ihre Geduld, ihre Unterstützung und ihr beharrliches Antreiben, hätte ich diese Dissertation nicht beendet.